

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1961 - N° 12

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU DOSAGE DES PIGMENTS BILIAIRES
DU SÉRUM SANGUIN**

(bilirubine totale et fraction non conjuguée)

THÈSE
présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON
et soutenue publiquement le 6 Novembre 1961
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

MONNET Louis

né le 18 Février 1930

à Vieu-d'Izenave (Ain)

F. ANDRE

5, rue Bugeaud

LYON

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1961 - N° 12

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU DOSAGE DES PIGMENTS BILIAIRES
DU SÉRUM SANGUIN**

(bilirubine totale et fraction non conjuguée)

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON
et soutenue publiquement le 6 Novembre 1961
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

MONNET Louis

né le 18 Février 1930

à Vieu-d'Izenave (Ain)

F. ANDRE

5, rue Bugeaud

LYON

Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire

M. H. HERMANN : Doyen,
Correspondant de
l'Institut

M. M. LEVRAT, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM. HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène mentale
ROCHET	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
FROMENT	Clinique et Prophylaxie Cardio- Vasculaires
CROIZAT	Clinique Médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie Infantile
REVOL	Pharmacie Galénique et Matière Médicale
POLLOSSON	Clinique Gynécologique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique Médicale A
SOHIER	Hygiène et Action sanitaire et sociale
DUCLOS	Clinique Stomatologique
BERNHEIM	Clinique Médicale infantile et Hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie médicale et Pharmacodynamie

MM.

NETTIEN	Botanique et Cryptogamie
BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
COUDERT	Parasitologie et Pathologie Exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'Audio-Phonologie
PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
BRUN	Clinique de Pneumo-Phtisiologie
CREYSSEL Jean	Clinique Traumatologique des Membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie Pathologique
GIRARD Paul	Pathologie Générale et Expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie Chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie Médicale
GALY	Physio-Pathologie des Voies respiratoires
KEHL	Histologie
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des Maladies Infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
MONNET	Bactériologie

Professeurs à titre personnel

MM.

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
DORCHE	Technologie Pharmaceutique

MM.

Professeurs sans chaire

BANSSILLON	Obstétrique
ROMAN	Parasitologie
BERTOYE	Bactériologie
CIER J-François	Physiologie
CHATONNET	Physiologie
CIER André	Pharmacie et Pharmacologie
PERROT	Chimie organique et Toxicologie

MM.

Maîtres de Conférences-Agrégés

FEROLDI Jacques	Anatomie pathologique
CREYSSEL Roger	Chimie Biologique et Médicale

MM.

DUROUX Emile	Anatomie
BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène
GARIN Jean-Paul	Parasitologie
MORET Robert	Physique
ODDOUX Lucien	Botanique et Cryptogamie

MM.

Agrégés en Exercice

LECUIRE Jean	Chargé d'enseignement	Neuro-Chirurgie
MATHIEU Jacques		Obstétrique
MARION Joseph		Orthopédie
PONT Maurice	Chargé d'enseignement	Propédeutique Médicale
VIGNON Georges	"	Pathologie Médicale
REVOL Louis	"	Pathologie Médicale
JAUBERT de BEAUJEU	"	Pathologie Chirurgicale
GUILLEMIN Georges	"	Propédeutique Chirurgicale
BURTHIAULT René	"	Obstétrique
FRANCOIS René	"	Pédiatrie, Puériculture
GUINET Paul		Médecine Générale
SAUTOT Jean		Pathologie Chirurgicale
MARION Pierre		Chirurgie Générale
MICHAUD Pierre		Chirurgie Générale
GIGNOUX Marcel		Oto-Rhino-Laryngologie
FREIDEL Charles		Stomatologie
PLAUCHU Marcel		Médecine Générale
TRAEGER Jules		Médecine Générale
DEVIC Michel	Chargé d'enseignement	Pathologie Médicale
COLIN Marcel	"	Médecine Légale
GUYOTAT Jean	"	Neurologie
DUMONT Martial	"	Obstétrique
DURAND Louis	"	Urologie
de MOURGUES Georges	"	Chirurgie Générale
DESPIERRES Charles	"	Médecine Générale
FRANCILLON Jacques		Chirurgie Générale
TOLOT François		Médecine du Travail
SAUBIER Eugène		Chirurgie Générale
COLOMB Daniel		Dermatologie
SCHOTT Bernard		Neurologie, Psychiatrie
BONAMOUR Georges		Ophtalmologie

Examineurs de la Thèse

MM. J. DORCHE, L. REVOL, B. DREVON, M. PLAUCHU



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MA FEMME

A MON FILS

A MES PARENTS

modeste témoignage de ma gratitude

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A L'INTERNAT EN PHARMACIE DES HOPITAUX DE LYON

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur J. DORCHE
Professeur de Technologie Pharmaceutique
Pharmacien des Hôpitaux

Durant un semestre d'Internat en Pharmacie passé dans son service hospitalier, nous avons pu bénéficier de sa connaissance et de son expérience de l'analyse biologique. Tout au long de nos études, nous avons pu apprécier les qualités du maître et de l'homme. Il a bien voulu assumer la direction de ce travail.

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur L. REVOL

Nous avons toujours trouvé auprès de lui l'accueil le plus bienveillant. Nous lui en sommes très reconnaissants et plus particulièrement pour l'intérêt qu'il nous a témoigné en voulant bien nous conseiller et nous juger.

Nous le prions d'agréer l'expression de nos sentiments respectueux.

Monsieur le Professeur B. DREVON

Il nous a fait un grand honneur en nous confiant la responsabilité d'un enseignement dans son laboratoire et en acceptant de juger cette thèse.

Nous le prions d'accepter nos remerciements et l'expression de notre déférence.

Monsieur le Professeur Agrégé M. PLAUCHU

Nous gardons le meilleur souvenir du semestre passé dans son service hospitalier, et nous lui savons gré de nous avoir montré l'intérêt de ce travail.

Nous le remercions vivement de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de siéger parmi nos juges.

INTRODUCTION

Depuis le début du siècle, la question des pigments biliaires présents dans le sang au cours des ictères, a suscité de nombreux travaux de nature biochimique ou analytique, et l'importance d'une détermination précise de ces pigments nous est apparue au cours de nos séjours dans les hôpitaux.

Dans l'ictère hémolytique du nouveau-né, le médecin transfuseur se base sur le taux de bilirubine du sérum pour décider de l'opportunité d'une exsanguino-transfusion. On a constaté avec regret (22), l'absence de standardisation dans les méthodes de dosage, ce qui peut conduire dans certains cas à des résultats très différents, donc difficiles à utiliser par le clinicien.

En dehors de la détermination de la bilirubinémie totale, l'évaluation précise des différentes fractions de pigment pouvant se trouver dans le sang au cours des ictères paraît utile, et de nombreuses méthodes ont été proposées pour résoudre ce problème. Comme ces techniques reposent sur des principes quelquefois très différents, nous avons été amenés à l'étude analytique de l'ensemble de cette question.

Ce sont les résultats de ce travail que nous proposons aujourd'hui; ils se concrétisent essentiellement par des méthodes simples et fidèles qui reposent sur des bases expérimentales suffisamment solides pour permettre leur utilisation en clinique.

Nous savons après un recul de plus de deux années que notre méthode de dosage de la bilirubinémie totale donne satisfaction dans les laboratoires où elle remplace la classique technique d'HIJMANS VAN DEN BERGH, plus complexe et moins précise.

Notre méthode de dosage de la bilirubine non conjuguée (ou "indirecte"), est utilisée dans certains hôpitaux lyonnais depuis quelques mois seulement, et il faut attendre encore pour savoir si elle est susceptible de fournir aux cliniciens les renseignements qu'ils désirent.

TRAVAUX ANTERIEURS

RAPPEL DE BIOCHIMIE CONCERNANT LES PIGMENTS BILIAIRES

Avant d'aborder l'étude des méthodes de dosage de la bilirubine sérique, il nous semble nécessaire de rappeler les notions admises à l'heure actuelle concernant les pigments biliaires.

I. Historique des travaux sur la bilirubine

La réaction qualitative de VAN DEN BERGH (1916), étape importante dans la connaissance des pigments biliaires, a montré la présence possible dans les sérums ictériques de deux formes de bilirubine, dont l'une seulement réagit directement avec le diazoréactif (acide sulfanilique diazoté).

De très nombreux travaux ont suivi cette découverte, et le problème de la nature des pigments circulants n'est pas encore résolu de façon définitive.

Nous nous limiterons à l'exposé des éléments fondamentaux utiles à la compréhension des différents chapitres de ce travail, et aux théories les plus importantes dans ce domaine.

Certains auteurs avaient pensé dès 1927 (41) que la fraction à réaction indirecte était constituée par la

bilirubine acide, mais, sans doute en l'absence de faits expérimentaux probants, il ne semble pas que ces travaux aient été pris en considération.

En 1942, FIESSINGER et ses collaborateurs (55) avaient cru démontrer que la bilirubine libre donnait la réaction directe alors que la réaction retardée était due à la bilirubinoglobine, combinaison provenant de la dégradation incomplète de la molécule d'hémoglobine. Cette conception, également admise par d'autres auteurs (WATSON en particulier), fut définitivement abandonnée à la suite des publications anglaises de BILLING (20), COLE (40) et LATHE. Ces auteurs montrent en effet, entre 1954 et 1957, que la fraction "directe" est constituée de deux conjugués glycuroniques, alors que la réaction retardée est donnée par la bilirubine libre. Nous retrouvons des conclusions analogues dans les travaux publiés en 1956 par SCHMID aux Etats-Unis et par TALAFANT en Tchécoslovaquie.

Il restait cependant à déterminer de façon précise comment la bilirubine acide, absolument insoluble dans l'eau, peut se trouver dissoute dans le sérum sanguin, en particulier dans le cas d'ictères hémolytiques où sa concentration est quelquefois très élevée.

De nombreux auteurs ont étudié la question et en France, POLONOVSKI et BOURRILLON (89), puis BOURRILLON (23, 24, 25, 26) entre 1956 et 1958 démontrent que la bilirubine, quelle que soit sa forme circulante (conjuguée ou non), se trouve toujours dans le plasma liée à la sérumalbumine. Leurs conclusions, vérifiées par plusieurs méthodes, sont admises à l'heure actuelle par tous les auteurs.

Nous devons à ce sujet rappeler les travaux fondamentaux de BARAC et de son école (7, 12, 13, 14) qui montrent vers 1945 l'importance de la cénapse possible entre la bilirubine et la sérumalbumine, ainsi que la stabilisation anti-oxygène du pigment par les protéines plasmatiques ou la sérumalbumine seule. Malheureusement,

tous ces travaux avaient été réalisés "in vitro" à pH voisin de 10, et c'est peut-être la raison pour laquelle on n'entrevoit pas leur application dans le domaine des êtres vivants.

Les découvertes précédentes, qui ont identifié les pigments à réaction directe à des conjugués glycuroniques, ont aussi mis en évidence le fait que ces composés ne représentent pas la totalité de la fraction "directe". Nous trouvons en effet sous la plume de FALLOT (52) : "BILLING démontre que le traitement de la bile en milieu alcalin convertit la bilirubine directe en bilirubine indirecte mais pas complètement, ce qui laisse supposer l'existence d'un type encore inconnu de conjugaison...".

Plusieurs hypothèses ont été proposées, parmi lesquelles les plus importantes sont :

- l'influence des sels biliaires
- le rôle de l'acide sulfurique.

Influence des sels biliaires

Elle est mise en évidence par l'expérience suivante : une solution aqueuse alcaline de bilirubine additionnée de diazoréactif devient acide et la réaction prend l'allure dite "indirecte", mais cette réaction devient "directe" si on ajoute des sels biliaires à la solution de bilirubine. D'autre part, dans ce dernier cas, le pigment est dialysable alors qu'il ne l'est pas dans le premier.

BAUMGARTEL (15) avait remarqué en 1950 que pendant l'évolution des ictères obstructifs, il se produit une augmentation de la fraction "indirecte". Cet auteur avait attribué ce phénomène au déficit de la synthèse des acides biliaires par le foie défaillant.

A l'heure actuelle BOURRILLON (25, 26, 27) obtient tous les caractères des sérums d'ictères par rétention en ajoutant de la bile à du sérum humain normal. En s'appuyant également sur le fait qu'il a été possible de synthétiser une taurobilirubine donnant une réaction directe, cet auteur pense que le rôle des acides glycuroniques dans la conjugaison de la bilirubine pourrait être moins important qu'on ne le pense en général.

Nous citerons encore une phrase de FALLOT(52) : "Enfin, sans prendre parti sur le fond du problème, nous avons remarqué avec CHABROL qu'il existait une corrélation assez remarquable entre le taux de sels biliaires sanguins et celui de la bilirubine directe. Nous savons maintenant qu'il s'agit d'une simple coïncidence".

Rôle de l'acide sulfurique

L'hypothèse d'une estérification des hydroxyles terminaux de la molécule de bilirubine avait été soulevée en 1957 par GRODSKY et CARBONE (62). Mais c'est ISSELBACHER (68) qui démontre la présence de sulfate de bilirubine dans la bile. Deux remarques sont à la base de ses travaux : le foie est capable d'effectuer la sulfoconjugaison de certaines substances et la bile contient de 10 à 15 p. 100 de pigment stable en milieu alcalin (BILLING a montré que, dans ces conditions, les glycuconjugués sont stables).

Les expériences d'ISSELBACHER sont pratiquées sur des biles de rats et de chats traités par injection intrapéritonéale de sulfate marqué sur l'atome de soufre (soufre 35). Après diazotation, les azoïques sont purifiés et séparés des sels biliaires, puis étudiés par chromatographie. On constate alors que la radioactivité se retrouve dans la fraction donnant la réaction directe et que cette fraction radioactive possède les mêmes propriétés chromatographiques que le sulfate de bilirubine préparé par synthèse. Après élution, la fraction radioactive est stable en milieu alcalin à 25°C et à 37°C, mais rapidement hydrolysée à 100°C dans l'acide chlorhydrique N. On ne peut identifier de taurine marquée dans les produits d'hydrolyse.

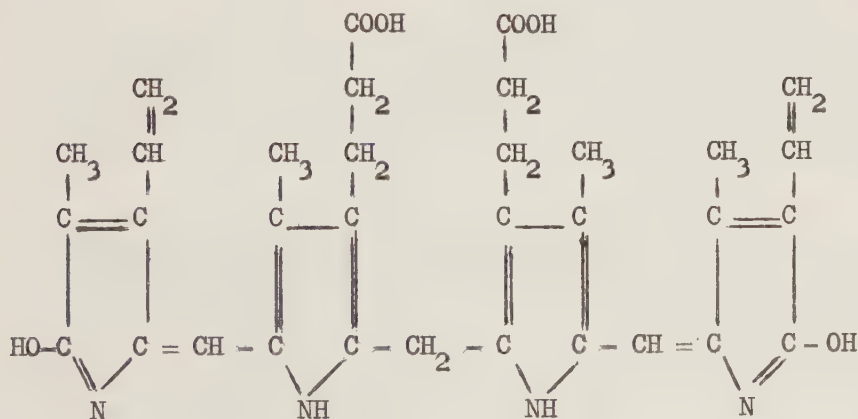
L'auteur pense donc qu'en plus des glycuronides qui représentent sans doute la majeure partie de la fraction à réaction directe, on trouve d'autres conjugués, en particulier avec l'acide sulfurique.

Pour conclure ce résumé des travaux sur la biochimie de la bilirubine, nous citerons l'opinion suivante de SCHMID (97), qui semble représenter la tendance actuelle : "Il est certain que chez l'homme, le chien, le rat et le mouton, la formation de glycuronides est le principal mécanisme par lequel la bilirubine est rendue hydrosoluble, alors que les autres mécanismes conjugués semblent être de moindre importance".

II. Métabolisme de la bilirubine dans l'organisme

Nous pouvons admettre à l'heure actuelle avec WITH (112) que "la bilirubine provient de l'hémoglobine catabolisée dans l'ensemble de l'organisme, plus particulièrement dans le système réticulo-endothélial et surtout, pour la plus grande part, dans les cellules du foie".

Avant d'aborder le métabolisme proprement dit, nous devons rappeler brièvement la constitution de cette substance, dont la formule est la suivante :



Par rapport à l'hémoglobine, on note donc :

- une scission entre la globine et le groupement prosthétique
- une libération de l'atome de fer
- une ouverture du noyau tétrapyrrolique.

Cette bilirubine acide, insoluble dans l'eau, est libérée dans le flux sanguin où elle s'unit immédiatement à la sérûmalbumine pour donner un composé stable et soluble. Le complexe ainsi formé constitue, dans les conditions physiologiques, la petite quantité de bilirubine à réaction indirecte retrouvée dans le sérum de tous les individus. La production de pigment étant pratiquement ininterrompue, il existe, dans l'organisme normal, un processus d'élimination qui maintient le taux sanguin entre 2 et 10 mg par litre environ.

Le mode d'élimination de la bilirubine étant encore très controversé, et loin d'être connu dans tous ses détails, nous nous bornerons à des notions classiques très générales. On admet que le foie joue dans ce domaine un rôle prépondérant, et selon SCHMID (97) : "le rôle du foie dans le métabolisme de la bilirubine paraît comprendre deux fonctions séparées : d'abord la conjugaison, ensuite l'excrétion".

Il importe donc de distinguer un défaut de cette excrétion d'une obstruction mécanique, qui empêche l'écoulement normal de la bile dans la vésicule biliaire et l'intestin (dans ce dernier cas l'ictère sera d'origine extra-hépatique).

Les pigments subissent dans l'intestin des transformations importantes que nous n'étudierons pas, puisque nous nous sommes limités à la bilirubine elle-même.

III . Déviations pathologiques du métabolisme de la bilirubine

Ces déviations se traduisent en clinique par les ictères, et nous voudrions, dans ce court chapitre, essayer d'expliquer quelles sont, du point de vue métabolique, les modifications pouvant engendrer un ictère.

A. HYPERBILIRUBINEMIE SANS DIAZOREACTION DIRECTE POSITIVE

Selon SCHMID (97), ce type d'ictères peut être dû à deux anomalies absolument distinctes :

- la surproduction de bilirubine

Dans ce cas, lorsque la production atteint le triple environ de sa valeur normale, le foie ne peut débarrasser le sang de tout le pigment formé (cas typique de l'ictère d'origine hémolytique).

- la conjugaison défectueuse au niveau du foie

Il semble que le phénomène de conjugaison soit indispensable à l'excrétion de la bilirubine et pour FALLOT (52) : "le trouble métabolique héréditaire de la cholémie de GILBERT réside bien dans une déficience de l'activité transférasique du foie. Cette déficience n'est pas limitée à la seule conjugaison de bilirubine mais à celle de certains phénols".

Comme on peut trouver dans la cholémie de GILBERT une certaine quantité de bilirubine directe dans la bile, il faut admettre pour expliquer ce phénomène :

* soit un défaut enzymatique partiel

* soit une autre voie métabolique susceptible d'assurer la conjugaison (et il faut noter ici l'existence d'une activité transférasique notable au niveau du rein.)

B. HYPERBILIRUBINEMIE AVEC PRESENCE D'UNE DIAZOREACTION DIRECTE

Selon WITH (112), deux cas sont possibles :

- l'obstruction mécanique des voies biliaires externes
- les lésions parenchymateuses (hépatites) d'origine infectieuse ou toxique.

De nombreux auteurs pensent qu'après rupture des canalicules biliaires très fins, il se produit un déversement de la bile dans le sang. Pour WITH, il s'agirait d'un mécanisme différent, appelé ictère lymphogénique : il y aurait seulement "disparition de la voie normale de passage sang-bile au profit de la voie secondaire sang-lymphe". La bilirubine conjuguée rejoindrait ensuite le sang par les voies normales.

Par conséquent, selon la nature des lésions hépatiques, nous pourrions trouver :

- une bilirubinémie avec pigment conjugué exclusivement, si la fonction d'excrétion ou les voies biliaires externes sont seules touchées (en particulier dans les ictères obstructifs à la phase initiale).
- une bilirubinémie de type mixte (pigment conjugué et non conjugué) si, en outre, la fonction enzymatique est atteinte.

Ces quelques notions très simplifiées sont suffisantes pour éclairer l'étude des méthodes de dosage, et aussi l'intérêt, pour le clinicien, du dosage séparé des différentes fractions sanguines. Nous insisterons cependant sur le fait que tous les phénomènes ne sont pas expliqués.

Les quelques exemples suivants sont tirés d'un travail de WITH (112) :

* Chez les bovidés, il est impossible de faire apparaître un ictère par occlusion biliaire complète ou par lésion du parenchyme hépatique.

* Chez le cheval, qui possède normalement une bilirubinémie très élevée, il existe un mécanisme que nous ignorons, puisque cet animal n'excrète son pigment ni par la bile ni par l'urine.

* En médecine humaine, on constate que, chez le nouveau-né, la bilirubine est toxique pour le système nerveux central si la concentration dans le sérum dépasse 200 mg par litre environ (ictères nucléaires - ou cérébraux - décrits par SCHMORL en 1900), mais de tels phénomènes n'ont jamais été décrits chez l'adulte.

On a montré que seule la bilirubine non conjuguée est susceptible de donner de tels accidents, ce qui explique leur absence chez l'adulte, puisque ce dernier possède un système transférasique hépatique suffisant pour conjuguer de grandes quantités de pigment (dans les ictères hémolytiques graves de l'adulte, la bilirubinémie n'atteint pas la concentration dangereuse pour le système nerveux).

On ignore par contre pourquoi les pigments conjugués ne présentent pas les mêmes propriétés puisqu'au cours des ictères obstructifs la bilirubinémie peut dépasser très largement 200 mg par litre. On suppose que cette différence de toxicité provient d'une différence de solubilité dans les lipides; cette hypothèse est vraisemblable, elle n'a cependant pas été vérifiée de façon satisfaisante.

Ces quelques exemples montrent donc que, malgré la découverte très importante des conjugaisons de la bilirubine au niveau du foie, de nombreux phénomènes expérimentaux ou cliniques restent inexpliqués.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES GENERALES

(tableau emprunté à WITH - 112)

1°. Caractères valables pour les deux formes
(directe et indirecte)

- Se trouvent dans le plasma sous forme de complexe avec la sérumalbumine
- Coloration jaune intense
- Donnent par oxydation des dérivés fortement colorés
- Donnent par copulation avec l'acide sulfanilique diazoté, un azoïque de coloration rouge à pH voisin de 7 (réaction très sensible).

2°. Caractères différentiels

Bilirubine à réaction directe :

- sous forme d'esters glycuroniques
- soluble dans l'eau
- coloration immédiate avec le diazoréactif
- insoluble dans le chloroforme et le benzène
- peu stable vis-à-vis des agents oxydants
- peu sensible à la lumière

Bilirubine à réaction indirecte :

- sous forme libre (non conjuguée)
 - insoluble dans l'eau
 - coloration retardée ou nulle (diazoréactif)
 - soluble dans le chloroforme et le benzène
 - très stable à l'obscurité (oxydation)
 - très sensible à la lumière
-

DOSAGE DE LA BILIRUBINE SERIQUE TOTALE

Les méthodes proposées dans ce but peuvent être classées en trois catégories :

- colorimétrie directe
- colorimétrie après oxydation
- colorimétrie après copulation avec un diazoïque.

I. Colorimétrie directe

La bilirubine possédant un pouvoir colorant très important, les premières méthodes de dosage utilisaient la coloration jaune intense des sérums ictériques; la plus ancienne est sans doute celle de MEULENGRACHT (82) publiée en 1920. Cet auteur préconisait la comparaison des sérums centrifugés à une série de témoins constitués par des solutions de bichromate de potassium.

CHABROL, BENARD et GAMBILLARD (28), en 1922, proposent comme référence une solution d'acide chromique.

FIESSINGER et WALTER (57), en 1931, préparent une solution de bichromate de potassium et d'hélianthine pour obtenir une coloration plus comparable à celle des sérums ictériques.

Tous ces auteurs utilisent pour leurs dosages la colorimétrie visuelle, tantôt à l'aide de tubes gradués de GRIGAUT, tantôt au moyen d'un colorimètre de type DUBOSCQ.

Actuellement, ces méthodes ne sont plus guère utilisées. Nous allons essayer d'en indiquer les raisons :

- La coloration des témoins n'est pas toujours comparable à celle des sérums (on sait en effet que cette coloration peut, selon le type d'ictère, varier du jaune-orangé au jaune-verdâtre).

- La colorimétrie visuelle manque de sensibilité.

- Certains auteurs ont invoqué, comme cause d'erreur principale, la présence de carotène dans certains sérums (63). Dans les cas douteux, il est d'ailleurs possible de distinguer les deux pigments par une réaction d'oxydation - citée par SIRJEAN (98) - utilisant un mélange d'acide phosphorique et de perhydrol : le carotène est décoloré alors que la bilirubine donne des composés colorés en vert.

Pour juger de la valeur de la colorimétrie directe, nous citerons les conclusions d'un travail de GUILLAUMIN (63) : "De l'ensemble des chiffres obtenus, il ressort tout d'abord que les méthodes basées sur la comparaison colorimétrique à des solutions de bichromate conduisent à des valeurs beaucoup plus élevées que celles obtenues par les deux autres méthodes (diazoréaction-limite et réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH en deux temps); il nous semble difficile de ne pas accorder aux pigments caroténoïdes un rôle important dans cette divergence et malheureusement susceptible de fortes variations".

Dans le cadre des méthodes avec colorimétrie visuelle, nous devons signaler une technique un peu particulière, proposée en 1942 par RIVOIRE. Cet auteur effectue les comparaisons après extraction benzénique de la forme non conjuguée avec, comme référence, des solutions d'acide picrique préalablement testées sur des témoins de bilirubine. Nous pensons que les résultats ainsi obtenus chez les sujets

normaux sont un peu faibles, puisque RIVOIRE considère comme une hyperbilirubinémie une valeur égale ou supérieure à 4 mg par litre (après plus de mille dosages), ce qui ne correspond pas aux chiffres généralement admis.

Nous dirons donc que la colorimétrie directe, malgré sa simplicité et sa rapidité, présente l'inconvénient des témoins plus ou moins empiriques, qu'elle donne selon ces derniers des résultats ou trop forts ou trop faibles, et enfin qu'elle manque de sensibilité.

Récemment, en 1958, BOURRILLON après des études importantes sur le spectre de la bilirubine (27), pense que le dosage spectrophotométrique pourrait devenir d'un usage courant en pratique clinique, les fractions libre et conjuguée ne présentant pas dans le sérum le même maximum d'absorption.

Cet auteur fait les constatations suivantes :

- les sérums normaux ou hémolytiques, comme les solutions de bilirubinate de sodium additionnées de sérum humain ou de sérumalbumine, présentent un maximum d'absorption situé vers 460 m μ .
- les sérums normaux additionnés de bile présentent un maximum bien individualisé à 420 m μ .
- les sérums ictériques naturels présentent toujours dans leur spectre un sommet à 450 m μ , et un second, souvent moins net, à 420 m μ .
- lorsqu'on isole le complexe pigment-sérumalbumine, ce dernier présente uniquement une réaction indirecte et un maximum d'absorption vers 450-460 m μ .

Les conclusions de cet auteur sont assez séduisantes, mais le maximum correspondant aux pigments conjugués n'est pas très net dans les courbes rapportées, et il se situe au voisinage de celui de l'hémoglobine, présente en petites quantités dans la plupart des sérums.

Nous n'avons pas retrouvé de travaux postérieurs importants sur le dosage spectrophotométrique des pigments biliaires sanguins.

II. Colorimétrie après oxydation

GILBERT, HERRSCHER et POSTERNAK avaient proposé en 1903 (60), une réaction d'oxydation par superposition du sérum à l'acide nitrique nitreux. Selon GUILLAUMIN (63), la difficulté d'interprétation des anneaux obtenus, diversement colorés selon le stade d'oxydation, n'a pas permis à cette méthode de fournir des résultats valables. Selon CHABROL, CHARONNAT et BUSSON (33), le reproche essentiel est qu'elle "n'est point d'une grande sensibilité, puisqu'elle ne permet pas de déceler moins de 2 cg de bilirubine par litre".

La méthode colorimétrique proprement dite repose sur le fait que la bilirubine, dans des conditions déterminées, donne par oxydation des composés colorés en vert intense. Cette propriété avait été mise en évidence par GRIGAUT sur la constatation suivante faite en 1920 : le précipité trichloracétique des protéines du sérum ictérique prend une coloration verte. Sur ce même principe nous trouvons la méthode de FOUCHET, qui utilise un mélange d'acide trichloracétique et d'un oxydant (perchlorure de fer).

Ces procédés basés sur la coloration des précipités ne peuvent être considérés comme de véritables méthodes de dosage, d'autant plus que, selon GUILLAUMIN (63), celui de GRIGAUT est plus sensible que celui de FOUCHET.

Ce sont CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (29) qui ont utilisé de façon rationnelle la coloration verte obtenue par oxydation des pigments biliaires dans leur méthode dite : "oxydabilité totale". Ces auteurs utilisent comme oxydant le mélange d'une solution de nitrite de sodium et d'acide phosphorique officinal, et ils effectuent les lectures de densité optique avec un photomètre Jouan sous écran rouge. L'étalonnage de l'appareil s'opère sur des solutions de bilirubine dans la soude 0,1 N, diluées par du sérum humain normal dans la proportion de 2 ml de sérum pour 0,5 ml de solution aqueuse. Dans les conditions opératoires, les auteurs obtiennent lors de l'étalonnage une droite jusqu'à la concentration de 30 mg par litre. Les résultats chez les sujets normaux sont compris entre 2 et 10 mg de pigment par litre de sérum.

Cependant, la coloration après oxydation ne semble pas avoir été retenue en pratique, sans doute à cause de son manque de sensibilité par rapport à la réaction dite "de diazotation".

III. Colorimétrie après copulation avec un diazoïque

1°. DISCUSSION DE LA REACTION UTILISEE

C'est HIJMANS VAN DEN BERGH qui découvrit la réaction de l'acide sulfanilique diazoté avec la bilirubine et, quarante années plus tard, la plupart des méthodes proposées reposent encore sur ce même principe. Nous n'avons en effet retrouvé qu'une seule publication utilisant un autre diazoïque (78) : celui de la diamino 4 4' - diphenyl sulfone.

En ce qui concerne l'utilisation du réactif de VAN DEN BERGH, deux facteurs importants sont à noter : le pH et la composition du milieu dans lequel est réalisée la réaction colorée.

* le pH

Les différentes techniques inspirées des travaux de VAN DEN BERGH n'utilisent pas, pour la préparation du diazoréactif, la même quantité d'acide chlorhydrique. Les deux formules les plus courantes renferment :

- 15 ml d'acide pur pour la première
- 15 ml d'acide dilué à 25 p. 100 pour la seconde.

Avec la méthode à l'alcool éthylique de l'auteur hollandais, on obtient avec l'une ou l'autre des formules précédentes un milieu sensiblement neutre et l'azoïque formé dans ces conditions présente une coloration rose ou rouge selon la quantité de pigment.

Avec d'autres procédés, et en particulier avec les mélanges contenant du benzoate de sodium, la concentration en acide peut avoir une certaine influence sur la limpidité du milieu (92) par insolubilisation de l'acide benzoïque formé.

De plus, le pH joue un rôle dans la coloration obtenue : l'azoïque, rouge en milieu sensiblement neutre, devient violet puis bleu en milieu alcalin. Cette dernière propriété est à la base d'un certain nombre de méthodes utilisant comme référence :

- soit des témoins de bilirubine (JENDRASSIK a proposé une méthode de ce type)
- soit des solutions de violet de gentiane ou de bleu de méthylène.

Cependant, la plupart des auteurs restent dans le cas le plus simple, c'est-à-dire qu'ils utilisent un pH sensiblement neutre, procédé donnant une coloration très sensible et reproductible, sans doute par suite du pouvoir tampon du sérum lui-même.

* la composition du milieu

L'influence des solvants ou des réactifs ajoutés au sérum explique peut-être les résultats discordants relevés entre certaines publications relativement anciennes. Plusieurs études sur les conditions de la réaction d'HLJMANS VAN DEN BERGH ont été réalisées depuis 1950, et nous citerons celles qui nous paraissent les plus intéressantes :

- KILCHING et KUHN (76) étudient la diazoreaction dans des solutions de bilirubine déprotéinisées ou non et montrent en particulier le rôle de la caféine qui, en solution pure, amène une diminution plus ou moins importante de la coloration, phénomène très atténué en présence de protéines.
- FRIEDMAN (59), étudiant plus particulièrement la méthode de MALLOY et EVELYN (79), constate que l'intensité de la réaction en solution aqueuse représente 73 à 90 p. 100 de celle de la réaction effectuée en présence d'alcool méthylique. Il en déduit que l'application de ce principe aux dosages de bilirubine directe et de la bilirubine totale ne reposerait en fait que sur un artéfact.
- BARAC (10) compare différents mélanges destinés à "révéler" la bilirubine ne réagissant pas directement et constate que l'intensité de la "diazocouleur" n'est pas constante et n'est pas toujours stable dans le temps.
- JIRSA et JIRSOVA (74), en 1959, étudient l'influence du pH, de l'alcool et de l'albumine sur le spectre des azoïques obtenus par copulation de la bilirubine libre au tau-roconjuguée avec le diazoïque de l'acide sulfanilique. Ils montrent en particulier que la densité optique est

augmentée en présence d'alcool et mettent en évidence une erreur systématique dans la méthode de MALLOY et EVELYN (dans cette méthode l'étalonnage est réalisé à l'aide de solutions alcoolochloroformiques de bilirubine).

Il semble donc nécessaire, pour un dosage de bilirubinémie totale, de réaliser des conditions très strictes et facilement reproductibles d'une expérience à une autre. On notera d'autre part que les témoins utilisés comme référence doivent avoir une composition aussi proche que possible de celle du sérum sur lequel est pratiqué le dosage.

Après ces quelques données générales, nous résumerons les différentes méthodes proposées en nous limitant à celles qui opèrent en milieu neutre et, dans ce groupe, aux plus courantes.

2°. EXPOSE DES METHODES DE DOSAGE

Ces méthodes seront classées d'après le procédé utilisé pour "révéler" la fraction de la bilirubine sérique dite indirecte selon la terminologie d'HELMANS VAN DEN BERGH.

* méthode à l'anneau-limite

Cette technique, mise au point par CHABROL, CHARONNAT et BUSSON (31, 33), permet le dosage de la bilirubine totale et superposant le diazoréactif à une série de dilutions du sérum dans une solution de sulfate de sodium à 15 p. 100. La lecture est effectuée au bout de quinze minutes sur fond blanc, une réaction positive se traduisant par un anneau coloré au niveau de la surface de séparation des deux liquides. La dernière dilution qui donne encore une réaction positive correspond à une concentration de pigment égale à 2 mg par litre.

Ce procédé qui ne demande aucun appareillage coûteux reste encore assez employé en France, mais il présente l'inconvénient majeur de donner des valeurs plus élevées que la plupart des autres techniques (35). Les auteurs n'ont pas fixé de valeur limite chez les sujets normaux, mais on doit encore considérer comme physiologique un taux de 16 mg par litre selon SIRJEAN (98), et de 25 mg par litre selon POLONOVSKI et COLIN (88).

Pour cette seule raison, beaucoup d'auteurs pensent qu'il est préférable de l'éviter; les écarts relevés avec les autres méthodes peuvent sans doute expliquer, à notre avis, les résultats divergents rapportés par BOREAU et DAVID (22) en 1957.

* méthodes utilisant l'alcool éthylique

Ces méthodes sont les plus anciennes, puisqu'elles sont dues à HIJMANS VAN DEN BERGH qui proposa deux techniques selon le résultat de la diazoréaction qualitative :

- en un seul temps si le sérum renferme de la bilirubine conjuguée
- en deux temps (défécation alcoolique puis réaction colorée) si la diazoréaction "directe" est négative.

Ces méthodes sont bien connues, et nous rappellerons seulement à leur sujet quelques notions importantes :

- l'alcool rompt les liaisons existant entre la bilirubine et la sérumbilumine en précipitant les protéines, ce qui rend nécessaire une centrifugation pour obtenir un liquide clair.
- dans la méthode en deux temps, la solution alcoolique se trouble quelquefois lorsqu'on la dilue au moment de la colorimétrie : ceci provient sans doute d'une modification du titre alcoolique au cours de la dilution.
- HIJMANS VAN DEN BERGH a proposé comme terme de comparaison une solution de sulfate de cobalt anhydre à 2,16 p. 100 à partir de laquelle il a établi une unité qui porte encore son nom; on considère en général que cette unité correspond à 4 ou 5 mg de bilirubine par litre, mais il est difficile de déterminer sa valeur avec précision.

- il est presque certain que le culot protéique retient une partie du pigment et, selon CHABROL, CHARONNAT et BUSSON (32), qui comparaient une solution aqueuse à une solution contenant de l'ovalbumine, la déperdition due à la précipitation des protéines est très importante. Ce n'est pas l'avis de tous les auteurs, puisque GUILLAUMIN (63) n'obtient pas dans tous les cas des résultats très inférieurs à ceux fournis par la diazoréaction-limite. Selon BILLING (20), le rendement de l'extraction serait voisin de 90 p. 100. En ce qui concerne la nature de la fraction retenue sur le précipité de protéine, les avis sont assez partagés, et il semble difficile de dire si la bilirubine non dosée par cette méthode se trouvait dans le sérum sous forme libre ou conjuguée.

Certains expérimentateurs ont voulu simplifier cette technique en négligeant systématiquement un des deux procédés de VAN DEN BERGH :

- GUILLAUMIN par exemple, dans un travail déjà cité (63), utilise toujours la réaction en deux temps.

- COTTE et MALLEIN (43) préfèrent la méthode en un seul temps; ils utilisent pour la lecture des résultats un électrophotomètre de MEUNIER dont l'étalonnage est réalisé avec des solutions aqueuses de bilirubinate de sodium en milieu alcalin.

Au sujet des valeurs fournies par cette méthode à l'alcool éthylique, HIJMANS VAN DEN BERGH admettait comme normaux des taux inférieurs à une unité, ce qui paraît un peu faible à notre époque, puisqu'on considère en général la concentration de 10 mg par litre comme la valeur limite au-dessous de laquelle on ne peut parler de processus pathologique.

En ce qui concerne le principe même de la technique, l'utilisation de l'alcool éthylique présente deux inconvénients :

- la précipitation des protéines qui nécessite une centrifugation
- la déperdition de pigment au cours de cette dernière opération.

* méthode utilisant l'alcool méthylique

MALLOY et EVELYN (79), ont proposé ce réactif en 1937 pour remplacer l'alcool éthylique dont nous venons de voir quelques inconvénients. Il est assez curieux de constater que cette technique, très utilisée dans les pays de langue anglaise, est loin d'être en tous points satisfaisante :

- selon les auteurs, la proportion d'alcool dans la réaction (50 p.100) donne une solution limpide, la densité optique maxima étant obtenue en trente minutes; ils conseillent cependant de placer dans la même main le tube témoin et le tube réactionnel, pour les agiter de façon rigoureusement identique, et diminuer l'erreur apportée par l'opalescence qui apparaît avec certains sérums.

- pour éviter la précipitation des protéines, les auteurs sont amenés à employer des quantités très faibles de sérum (deux fois moins qu'avec les réactifs à base de caféine par exemple), ce qui diminue la précision des mesures.

- l'étalonnage de l'appareil est réalisé avec des solutions alcoolo-chloroformiques de bilirubine, donc dans un milieu très différent du sérum sur lequel est normalement pratiqué le dosage.

On ne peut donc que se rallier à l'opinion de BENARD, GADJOS et TISSIER (16) : "la technique de MALLOY et EVELYN à l'alcool méthylique manque de sensibilité et d'autre part, tout en empêchant la formation d'un précipité proprement dit, donne un milieu non exempt de turbidité".

* méthodes sans précipitation des protéines n'utilisant pas l'alcool méthylique

Il semble que la première méthode de ce type soit due à JENDRASSIK (70), en 1928. Ce même auteur a proposé ensuite d'autres procédés, soit avec CLEGHORN (71) en 1936, soit avec GROF (72, 73) en 1938, qui ne sont que des adaptations ou des modifications de la méthode initiale. Depuis cette époque, nous trouvons de nombreuses études sur cette technique, et nous citerons seulement celles qui nous paraissent les plus intéressantes :

-- CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT proposent en 1949 le soluté faible de caféine inscrit au Codex (29) :

Caféine	25 g
Benzoate de sodium	35 g
Eau distillée	Q.S.P. 100 ml

-- le réactif de POLONOVSKI et COLIN (88) est moins concentré :

Caféine	5 g
Benzoate de sodium	10 g
Eau distillée	Q.S.P. 100 ml

-- la formule de WITH, adoptée par BENARD et ses collaborateurs (16), contient en outre de l'acétate de sodium :

Caféine	5 g
Benzoate de sodium	7,5 g
Acétate de sodium	12,5 g
Eau distillée	Q.S.P. 100 ml

-- le réactif proposé par RAPPAPORT et EICHHORN (93) est le premier dans lequel nous voyons apparaître l'urée : cette formule renferme aussi de l'acide citrique, du citrate de sodium et de la caféine.

-- POWEL (92) utilise un mélange de benzoate de sodium et d'urée :

Benzoate de sodium	10 g
Urée	10 g
Eau distillée	Q.S.P. 100 ml

- la formule de JOUVENCEAUX et REVOL (75) est dérivée de celle de POWELL :

Benzoate de sodium	25 g
Urée	15 g
Eau distillée	Q.S.P. 100 ml

- MONCKE (83), dans un travail assez original, propose de remplacer la caféine par du Salyrgan (hydroxymercuri - 3-méthoxypropyl-2-amidosalicyl-acétate de sodium) pour éviter l'erreur due aux protéines.

Nous aurons l'occasion d'étudier en détail certaines de ces formules, et nous rapportons seulement les conclusions formulées par POWELL (92), qui note :

- un trouble avec le réactif de JENDRASSIK, dû à la précipitation de l'acide benzoïque.

- de bons résultats avec le mélange de caféine, benzoate de sodium et urée.

- des résultats moins constants avec la formule de RAPPA-PORT et EICHHORN.

Cet auteur constate aussi :

- que le benzoate de sodium seul semble insuffisant et donne souvent un trouble d'acide benzoïque.

- que l'addition d'urée inhibe la précipitation précédente et, de plus, intensifie la coloration.

- que l'addition de caféine n'améliore pas les résultats donnés par le mélange de benzoate de sodium et d'urée.

L'étude de ces travaux montre que les résultats défavorables obtenus avec les solutions de benzoate de sodium et de caféine sont peut-être dûs à l'acidité trop importante apportée par le diazoréactif utilisé. Les différents expérimentateurs ne semblent en effet connaître qu'une des deux formules proposées par HIJMANS VAN DEN BERGH (celle qui renferme la plus grande proportion d'acide chlorhydrique).

En faveur de ce groupe de techniques, nous devons signaler un travail de BARAC (10) datant de 1957, dans lequel l'auteur utilise une formule dérivée de celle de JENDRASSIK et GROF. L'auteur considère cette méthode comme supérieure à toutes celles proposées

pour le dosage de la bilirubine totale sans précipitation des protéines.

Il semble donc que ces procédés permettent d'obtenir une coloration sensible, précise pour les taux normaux ou peu élevés. Mais, conséquence de cet avantage, il est nécessaire de diluer avant le dosage les sérums d'ictères graves trop riches en pigment.

* * *

3°. ETUDE DES DIFFERENTES SOLUTIONS TEMOINS PROPOSEES

Nous devons étudier avec soin cet aspect du problème, puisque nous savons maintenant que la réaction à l'acide sulfanilique diazoté est sensible au pH et aux composants du milieu dans lequel elle est réalisée.

a) Témoins empiriques

Nous citerons rapidement les deux plus courants :

- la solution de nitrate de cobalt de la méthode de VAN DEN BERGH
- la solution de rouge de méthyle proposée par HASLEWOOD et KING (64).

Le premier de ces témoins a servi à la détermination des unités HJLMANS VAN DEN BERGH, dont nous avons déjà souligné l'imprécision. La solution de rouge de méthyle semble mieux précisée et a été reprise par un certain nombre d'auteurs (POLONOVSKI et COLIN, BILLING, YI-YUNG HSIA). Elle est peut-être utile en l'absence d'appareil étalonné si sa correspondance en bilirubine est établie d'une façon rigoureuse.

b) Témoins de bilirubine

Comme on ne peut utiliser pour ces témoins que de la bilirubine pure, sous forme acide, tous les auteurs admettent que dans le milieu où s'opère le dosage, les différentes fractions (conjuguée et non conjuguée) réagissent avec la même intensité.

* solution chloroformique de bilirubine acide

Deux groupes d'auteurs préconisent cette solution témoin : ce sont MALLOY et EVELYN (79) d'une part, et ROWELL (92) d'autre part. Signalons que cette solution-mère est ensuite diluée avec de l'alcool de titre élevé ce qui donne une gamme de témoins dont les différents échantillons n'ont pas tous la même composition (proportions relatives de chloroforme et d'alcool). Rappelons aussi les travaux de JIRSA et JIRSOVA (74) qui montrèrent, en 1959, que la densité optique est augmentée en présence d'alcool, mettant ainsi en évidence une erreur systématique dans la méthode de MALLOY et EVELYN.

* solution aqueuse de bilirubinate de sodium

La bilirubine est dissoute dans un excès de soude, puis la solution-mère obtenue est diluée pour obtenir une gamme de témoins. Ce procédé est préconisé en particulier par COTTE et MALLEIN (43) et par POLONOVSKI et COLIN (88). Comme les dilutions sont réalisées avec de l'eau distillée ou avec une solution de soude, les différents échantillons n'ont pas la même alcalinité et nous pouvons faire les mêmes remarques que pour les témoins alcool-chloroformiques puisque, rappelons-le, le pH joue un rôle dans la réaction utilisée. Signalons encore que COTTE et MALLEIN préconisent, à la suite des travaux de BARAC (1), l'emploi de faibles quantités d'acide ascorbique pour assurer la conservation de la solution aqueuse. Mais si BARAC propose cette addition de vitamine C dans le suc duodénal, il ne termine pas son dosage par diazoreaction, et il affirme même dans un travail ultérieur (10), que l'acide ascorbique inhibe la réaction d'HIJMANS VAN DEN VERGH.

* solution d'azobilirubine

GRAY et WHIDBORNE (61) réalisent une diazoreaction sur une solution aqueuse concentrée de bilirubine et effectuent ensuite des dilutions avec de l'eau distillée pour la préparation d'une série de témoins.

Ce procédé semble peu rigoureux pour les deux raisons suivantes :

- la composition des témoins est différente de celle réalisée au cours des dosages eux-mêmes (on notera en particulier l'absence de sérumalbumine).
- la loi fondamentale de BEER-LAMBERT sur la colorimétrie ne peut être respectée en suivant ce mode opératoire.

Nous ne pouvons passer cette méthode sous silence puisqu'elle a été choisie par CHABROL BOSZORMENYI et FALLOT (29), et qu'elle peut par conséquent être adoptée par d'autres expérimentateurs.

* solution de bilirubine en présence de sérum ou de sérumalbumine

Les méthodes basées sur ce principe sont en apparence les meilleures, puisque la composition des témoins se rapproche de celle du milieu dans lequel est pratiquée la réaction.

- CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (29) utilisent ce procédé pour leur méthode dite d'oxydo-réaction; ils opèrent de la manière suivante :

préparation d'une série de témoins de bilirubinate dans la soude 0,1 N

addition de 4 volumes de sérum à 1 volume de solution aqueuse.

Le pH des témoins ainsi obtenus est sous doute élevé, mais ceci importe peu dans la méthode des auteurs puisqu'ils utilisent une oxydo-réaction en milieu très acide. Par contre, il semble qu'on puisse faire quelques réserves sur la valeur de ces témoins dans le cas où la technique de dosage repose sur le principe de la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH.

- JOUVENCEAUX et REVOL (75) s'attachent à la réalisation d'une solution de bilirubinate de sodium dans du sérum pur, ramenée au pH du sérum humain ayant servi à la préparation :

● 40 mg de bilirubine sont dissous dans 40 ml de sérum en ajoutant dans le mélange la quantité de solution de soude à 10 p. 100 nécessaire pour une dissolution totale (la quantité utilisée est exactement mesurée à la burette).

- dans un deuxième récipient un mélange de 40 ml du même sérum et de la quantité de soude utilisée dans l'opération précédente est neutralisé par une solution à 7 p. 100 environ d'acide chlorhydrique en présence de phénolphtaléine puis de papier indicateur jusqu'à l'obtention du pH du sérum initial.

- la quantité de solution acide ainsi déterminée est ensuite ajoutée goutte à goutte dans le récipient contenant la bilirubine, le pH obtenu est vérifié au papier indicateur. En complétant le volume à 100 ml avec du sérum, les auteurs obtiennent un témoin contenant, par litre, 400 mg de pigment artificiellement ajouté.

- cette solution-mère est alors diluée avec le sérum de départ pour obtenir une gamme de témoins de concentration croissante. La réaction colorée est réalisée sur tous les échantillons et sur le sérum normal utilisé, la valeur de la mesure effectuée sur ce dernier étant déduite de toutes les autres lors de la construction de la courbe d'étalonnage.

Utilisés avec une microméthode (sur 0,1 ml de sérum), ces témoins donnent, sur un électrophotomètre de MEUNIER, une droite jusqu'à une concentration sérique de 300 mg par litre.

- BARAC, au cours de travaux déjà cités (10), sur la standardisation et le dosage de la bilirubine plasmatique totale, indique un moyen de préparation de témoins de bilirubine dans une solution de sérumalbumine. Le pigment est dissous dans de la soude 0,1 N pour obtenir une concentration de 1 g par litre, la solution-mère ainsi obtenue étant ensuite diluée avec une solution de sérumalbumine à 5 p. 100 dans un mélange tampon de pH = 7,31.

Signalons encore que les recherches de cet auteur ont montré :

- que 1 g de sérumalbumine peut complexer 21 mg de bilirubine

- qu'il ne faut pas ajouter d'acide ascorbique pour stabiliser la solution aqueuse, comme nous l'avons déjà signalé.

En résumé, les méthodes respectives de BARAC et de JOUVENCEAUX et REVOL semblent les mieux indiquées pour l'étalonnage d'un photomètre en vue du dosage de la bilirubine totale du sérum.

DOSAGE SEPARÉ DES DIFFÉRENTES

FORMES DE BILIRUBINE

Les méthodes proposées pour résoudre ce problème sont très nombreuses et, plus encore que dans le cas précédent, nous sommes obligés de nous limiter aux principales, c'est-à-dire à celles qui semblent reposer sur les bases les plus solides.

La plupart des auteurs qui ont étudié la question du dosage de la bilirubine se sont appliqués à évaluer l'une ou l'autre des deux fractions principales (libre ou conjuguée) et, en nous reportant au tableau de la page 15, nous pouvons constater que trois caractères essentiels permettent de différencier ces deux formes :

- la vitesse de réaction avec le diazoréactif
- la solubilité de la bilirubine dans le chloroforme et le benzène
- la faible résistance de la bilirubine conjuguée vis-à-vis des oxydants.

Nous ne citerons que pour mémoire les procédés basés sur des principes différents, tous plus ou moins discutables à la lumière des travaux récents, et nous éliminerons en particulier les techniques reposant sur la caractérisation des différentes fractions des protéines liées à la bilirubine.

Il nous faut cependant rappeler les deux modes de différenciation suivants qui furent les plus étudiés, sans avoir pu toutefois résister à l'épreuve du temps :

- la différence dans le degré de l'alcool utilisé, technique proposée par HIJMANS VAN DEN BERGH et GROTEPASS (66) en 1934.

- la différence de pH étudiée par DE JONG (44) en 1942, puis reprise en 1952 par GEDICK et GRIES (ces deux derniers auteurs estiment qu'en milieu neutre les deux formes réagissent avec le sel de diazonium, alors qu'en milieu acide, seule la bilirubine conjuguée peut donner un azoïque).

Il ne semble pas que ces procédés aient fait l'objet de très nombreux travaux, et nous n'étudierons en détail que les applications des trois caractères différentiels rapportés ci-dessus.

I. Vitesse de réaction avec le diazoréactif

Il était logique de chercher à utiliser la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH pour le dosage de la fraction conjuguée, puisque cette dernière donne directement une coloration rose avec l'acide sulfanilique diazoté. De très nombreux auteurs ont utilisé ce principe pour un dosage, et nous retrouvons de multiples techniques basées sur cette propriété.

De l'ensemble des travaux effectués il semble qu'on puisse dégager trois caractères fondamentaux de cette réaction, nous les étudierons successivement.

INSTABILITE DE LA DENSITE OPTIQUE DANS LE TEMPS

Tous les auteurs semblent constater que la réaction, étudiée au photomètre, est progressive, et chacun propose d'effectuer la lecture au bout du temps qui lui paraît le meilleur. Comme le montre le tableau ci-dessous, qui réunit les travaux les plus importants, ce temps peut varier dans de très larges proportions :

YI-YUNG HSIA (114) : 1 minute

JOUVENCEAUX et REVOL (75) : dans la minute qui suit
l'apparition de la coloration rose

BENARD, GADJOS et TISSIER (16) : 3 minutes

JENDRASSIK et CLEGHORN (71) : 5 minutes

DUCCI et WATSON (48) : 1 minute pour la fraction
dite "rapide"

15 minutes pour la bilirubine
directe totale.

BILLING (20) : 30 minutes

MALLOY et EVELYN (79) : 120 minutes

Cette simple énumération montre qu'il est difficile de déterminer avec précision le temps au bout duquel la diazoréaction "directe" est totale, et il faut signaler qu'aucun des auteurs ne fournit de justifications à la technique qu'il propose, sauf BILLING.

SCHALM et SCHULTE (96) estiment de leur côté qu'une partie de la bilirubine non conjuguée donne lieu à la formation d'azoïque avant que la réaction "directe" véritable ne soit terminée. Pour cette raison, ils introduisent un coefficient de correction soustractif sur le résultat lu au bout de 10 minutes.

Seuls parmi les auteurs ayant proposé un temps déterminé, BENARD et ses collaborateurs (16) font preuve d'une grande prudence puisqu'ils écrivent : "les lectures sont faites à la fin de la troisième minute, car la coloration s'accuse avec le temps par transformation partielle de la bilirubine indirecte en bilirubine directe".

BILLING de son côté (20), applique la technique de MALLOY et EVELYN mais effectue la lecture au bout de 30 minutes seulement en prenant comme référence sa méthode personnelle basée sur une chromatographie sur colonne. Malheureusement l'étalonnage de son photomètre est réalisé à l'aide de solutions de rouge de méthyle, et on ignore dans quelles conditions a été établie la correspondance en bilirubine de ces solutions.

Devant de telles incertitudes, POLONOVSKI et COLIN (88) estiment qu'un dosage est très difficile dans ces conditions, et conseillent de se limiter à la réaction qualitative d'HIJMANS VAN DEN BERGH ou à la construction de la courbe des densités optiques en fonction du temps. Ces procédés donnent des renseignements suffisants pour déterminer si, dans le sérum, l'une des deux formes du pigment (conjuguée ou non conjuguée) est nettement prédominante.

ABSENCE D'ETALONNAGE SPECIAL POUR LE DOSAGE DE LA BILIRUBINE CONJUGUEE

Nous avons noté précédemment le rôle joué par les constituants du milieu réactionnel; or, tous les auteurs qui préconisent le dosage de la fraction conjuguée par la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH utilisent la courbe d'étalonnage construite pour la bilirubine totale. Certains calculent en outre la fraction non conjuguée par simple différence.

Cependant, BENARD et ses collaborateurs se refusent à ce calcul puisqu'ils écrivent : "cette détermination ne peut être faite qu'avec une approximation très grossière par différence, sous réserve que la bilirubine directe donne la même intensité de coloration en présence ou en l'absence de caféine".

Les travaux de FRIEDMAN (59) et ceux de JIRSA et JIRSOVA (74) permettent de penser que les réserves formulées par les auteurs précédents sont très largement justifiées.

INFLUENCE DU MODE DE REALISATION DE LA REACTION

Il faut remarquer que la réaction préconisée par HIJMANS VAN DEN BERGH se pratique sur du sérum pur ou dilué au demi, alors que toutes les méthodes photométriques utilisent du sérum très dilué. Ceci est à rapprocher des travaux de WESTPHAL et GEDIGK (111), et de ceux de CORA (42), montrant que la dilution des sérums ictériques a pour résultat un accroissement plus ou moins marqué de la

fraction de bilirubine qui réagit directement. Il est donc possible que dans de telles conditions une partie de la bilirubine non conjuguée réagisse avec le diazoré-actif.

Il semble que l'instabilité de la coloration soit le facteur essentiel; elle permet d'expliquer pourquoi les résultats de dosage de la bilirubine conjuguée sont quelquefois très différents d'un laboratoire à un autre. Il suffit en effet que ces laboratoires n'utilisent pas exactement le même temps de contact avant la lecture photométrique. C'est pourquoi nous signalerons une formule quelquefois adoptée dans les pays de langue anglaise, et qui devrait être employée pour exprimer tous les résultats obtenus à l'aide de ce procédé : il s'agit de la "one minute bilirubin". Il est regrettable que ce mode d'expression soit aussi peu répandu car, sans représenter un véritable dosage de la fraction conjuguée, il permettrait au clinicien de comparer utilement les valeurs obtenues dans différents cas pathologiques.

Pour donner le point de vue du clinicien au sujet de l'ensemble des travaux réalisés sur l'application de la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH au dosage de la bilirubine conjuguée du sérum, nous rapporterons l'opinion de FALLOT (52) : "De toutes ces études se dégage une certaine confusion qui peut être liée au fait que la quantité de bilirubine totale présente dans le sérum n'est pas sans influencer le rapport bilirubine directe sur bilirubine totale. Par ailleurs, ces subtilités n'ont pas permis de tirer d'enseignements suffisants pour qu'on puisse les retenir en pratique".

II. Extraction de la bilirubine non conjuguée par les solvants organiques

Deux solvants ont surtout été utilisés : le chloroforme et le benzène.

CHLOROFORME

L'emploi du chloroforme semble remonter à 1929 avec DE CASTRO d'une part et KERPOLA et LEIKOLA d'autre part. Les travaux fondamentaux dans ce domaine sont dus à VARELA-FUENTES et à son école entre 1931 et 1934; la technique définitive qu'ils proposent (100) permet de doser séparément la fraction conjuguée et la fraction non conjuguée.

- Pour extraire la bilirubine non conjuguée, on agite vigoureusement un mélange de sérum, de chloroforme et de solution de sulfate de sodium à 12 p. 100. Après centrifugation, la solution chloroformique est soigneusement décantée, puis une deuxième extraction pratiquée. Ces deux opérations sont en général suffisantes, mais, dans certains cas, il est nécessaire de procéder à quatre extractions successives. Les solutions chloroformiques sont évaporées sous vide à 80° C, puis le résidu est repris par un mélange d'alcool, de chloroforme et de diazoréactif.

- Pour doser la bilirubine conjuguée, le sérum qui vient d'être épuisé par le chloroforme est traité par l'alcool et le diazoréactif.

- Les deux solutions alcooliques colorées ainsi obtenues sont comparées à un témoin constitué par du sulfocyanure ferrique ou du sulfate de cobalt.

Pour juger ce procédé qui reste encore employé dans certains laboratoires, nous laisserons la parole à VARELA FUENTES et RECARTE eux-mêmes (100) : ces auteurs estiment en effet que le rendement de la réaction qu'ils proposent ne dépasse pas 80 p.100. Comme ils ont étudié l'extraction

par le chloroforme sous tous ses aspects, il semble donc que ce solvant ne puisse servir de base à une méthode quantitative de dosage de la bilirubine non conjuguée du sérum.

BENZENE

RIVOIRE a proposé ce solvant en 1942 (94) après une expérience portant sur plus de mille dosages dans de très nombreux cas pathologiques. On ne retrouve aucun travail postérieur jusqu'en 1957 où BESSON et FAUVERT reprennent le principe de l'extraction benzénique et améliorent la technique originale par l'emploi d'un spectrophotomètre. Nous rapporterons la méthode de RIVOIRE, puis nous signalerons les modifications récemment proposées.

RIVOIRE utilise 1 ml de sérum, il ajoute II à III gouttes de solution saturée de bromure de baryum et 2 ml de benzène puis agite vigoureusement pendant deux minutes. Après centrifugation, la couche benzénique est comparée à une série de témoins constitués par des solutions d'acide picrique dont la valeur a été auparavant déterminée par rapport à une solution de bilirubine dans du chloroforme.

La modification de BESSON, d'abord citée par FAUVERT et BENHAMOU (54) à propos de l'étude statique et dynamique de la bilirubine indirecte du sérum, est présentée comme une méthode de dosage de la bilirubine indirecte c'est-à-dire non conjuguée. En opérant sur 2 ml de sérum, BESSON effectue une lecture de densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre, l'étalonnage de cet appareil étant réalisé en faisant des extractions analogues sur des solutions aqueuses titrées de bilirubinate de sodium.

Quelques mois plus tard, en Juin 1958, BESSON et FAUVERT proposent de nouveau une technique analogue, mais ils recommandent deux extractions successives, car la première ne peut retirer, à leur avis, que 75 p. 100

de la fraction indirecte. On peut remarquer aussi que, dans la seconde publication, cette méthode est intitulée "dosage de la bilirubine benzène-extractible".

Les travaux récents semblent montrer d'autre part que la bilirubine conjuguée n'est pas extraite par le benzène dans les conditions de l'expérience (pas de fraction soluble dans la bile et l'urine en particulier). Par contre, on peut relever dans la technique de BESSON une différence entre l'étalonnage et le dosage lui-même, et ce fait semble important, puisque l'extraction est beaucoup plus facile lorsque la bilirubine se trouve sous forme de sel sodique en solution aqueuse.

Nous n'avons pas rencontré, au cours de nos recherches bibliographiques, d'autres travaux que ceux précédemment cités sauf quelques indications dans l'ouvrage de BENARD, GADJOS et TISSIER (16) : après quelques expériences, ces auteurs considèrent que le benzène est très supérieur au chloroforme pour l'extraction de la bilirubine non conjuguée.

Il semble donc possible de juger ainsi les méthodes qui utilisent une extraction par un solvant organique de la bilirubine non conjuguée du sérum :

- elles sont assez laborieuses (au moins deux extractions avec centrifugation)
- elles sont spécifiques
- elles ne paraissent pas quantitatives.

III. Action des agents oxydants

Cette propriété a surtout été étudiée par CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (29) et appliquée dans leur méthode dite : "oxydabilité relative". Ces auteurs utilisent un mélange de nitrite de sodium et d'acide phosphorique à 2 p. 100, ils obtiennent une coloration verte dont l'intensité passe par un maximum entre 3 et 5 minutes. Ils calculent la quantité de bilirubine oxydable en se reportant à la courbe construite pour leur méthode dite : "oxydabilité totale" déjà citée.

Les comparaisons effectuées avec d'autres procédés semblaient montrer des résultats intéressants et il est assez curieux de constater que ces travaux n'ont jamais été repris par d'autres auteurs. Pour cette raison, il est difficile de porter un jugement sur leur valeur.

On peut cependant dire que cette technique relativement simple repose sur une propriété caractéristique de la bilirubine conjuguée bien que les conditions d'obscurité, nécessaires selon WITH (112), ne soient pas exactement respectées. On peut déplorer aussi que, comme dans beaucoup d'autres travaux, les auteurs ne donnent pas de justifications expérimentales solidement établies. On ignore, en particulier, quels sont les résultats fournis par des sérums sans bilirubine conjuguée préparés artificiellement, ou, mieux encore, provenant de malades atteints d'ictères hémolytiques.

Il faut signaler aussi l'oxydoréaction-limite proposée par CHABROL et son école, dont les résultats étaient comparés à ceux fournis par la diazoréaction-limite. Il ne semble pas que ce procédé soit très intéressant pour le dosage de la bilirubine conjuguée.

IV. Dosage différentiel des pigments conjugués sanguins

METHODE CHROMATOGRAPHIQUE DE BILLING

BILLING (20), utilisant la chromatographie sur colonne parvient, en 1955, à séparer et à doser dans le sérum les trois fractions suivantes : bilirubine et pigments conjugués I et II (respectivement mono- et diglycuroconjugués).

Nous devons donner quelques détails sur la colonne de BILLING dont la réalisation est assez originale : il s'agit d'un piston de seringue, ouvert aux deux extrémités, découpé en trois tronçons maintenus en place par le corps de la seringue. Lorsque la migration est terminée, on libère les tronçons en les poussant avec un piston de même modèle, les trois pigments sont alors séparés sans difficulté.

La technique peut se résumer ainsi :

- extraction de la bilirubine totale par l'alcool éthylique en présence de solution saturée de sulfate d'ammonium, centrifugation et évaporation de l'alcool (sous vide à la température ordinaire).
- préparation d'une colonne de kieselguhr siliconé et disposition du résidu précédent au sommet de cette colonne.
- séparation des pigments avec un solvant à base de butanol, d'eau et de solution tampon à pH = 6 utilisé en phase inversée, puis isolement facile des pigments ainsi séparés, grâce aux tronçons de la colonne.
- dosage en plaçant les fractions de kieselguhr ainsi séparées dans des tubes à centrifuger et en les traitant par l'alcool et le diazoréactif à deux reprises.
- mesure de la densité optique au photomètre, l'appareil étant étalonné avec des solutions de rouge de méthyle.

Il est ainsi possible de réaliser le dosage des trois fractions en trente minutes, à partir de 1 ml de sérum seulement, mais la méthode est en défaut pour des sérums trop riches en lipides ou renfermant moins de 50 mg par litre de bilirubine totale. L'auteur, comparant ses résultats à ceux fournis par la technique de MALLOY et EVELYN, trouve une concordance assez nette si, dans ce dernier cas, la lecture de la réaction directe est effectuée au bout de trente minutes seulement.

BILLING semble donc avoir résolu le problème du dosage de la bilirubine conjuguée totale et celui des pigments I et II.

Cependant, la méthode proposée n'est pas exempte de critiques :

* Elle repose sur une extraction alcoolique dont nous avons déjà signalé l'imprécision, d'ailleurs confirmée par BILLING qui déclare retrouver dans le liquide de défécation "85 à 95 p. 100 de la bilirubine totale". Nous relevons de plus dans cette publication les contradictions suivantes qui méritent d'être rapportées :

- "le pigment adhèrent à un précipité alcoolique est connu pour être de type direct".

- "les expériences semblent montrer que les déperditions qui sont constatées sont le fait de l'ensemble des pigments et non d'une fraction particulière".

* Elle n'est pas applicable à tous les sérums ictériques.

* Elle n'est pas aussi facilement réalisable que le prétend BILLING, ceci ayant été récemment confirmé par HOFFMAN et ses collaborateurs (67).

* L'étalonnage du photomètre est réalisé à l'aide de solutions de rouge de méthyle et l'auteur n'indique pas comment est déterminée la correspondance en bilirubine de ces témoins.

Pour toutes les raisons que nous venons de signaler, nous porterons donc sur la méthode de BILLING un jugement réservé.

METHODE DE SCHACHTER

SCHACHTER (95) a proposé en 1959 une méthode de dosage séparé des deux glycuronides de la bilirubine, basée sur des solubilités différentes dans le butanol et dans le mélange butanol-chloroforme. Selon l'auteur, on obtient de façon beaucoup plus simple des résultats sensiblement identiques à ceux de BILLING. Il semble donc possible, par ce moyen, de doser séparément les glycuroconjugés sanguins.

Pour essayer de juger ces deux techniques, nous dirons qu'elles ne reposent pas sur des bases expérimentales solides, et qu'elles ne semblent pas, d'autre part, apporter au clinicien des renseignements fondamentaux. Sur ce dernier point, nous laisserons la parole à SCHACHTER : "le dosage des conjugués de bilirubine dans le plasma présente une valeur limitée pour le diagnostic, bien qu'un taux élevé de diglycuronide suggère une obstruction biliaire aiguë, et que des valeurs élevées de monoglycuronide suggèrent une atteinte du parenchyme hépatique.

CONCLUSION

Au terme de cette étude bibliographique, nous retiendrons les points suivants en ce qui concerne le dosage de la bilirubine du sérum sanguin :

* Pour le dosage de la bilirubine totale, la réaction de ce pigment avec l'acide sulfanilique diazoté, découverte par HIJMANS VAN DEN BERGH, conserve tout son intérêt puisqu'elle est à la base de la plupart des méthodes actuelles.

* Pour mettre en évidence la bilirubine non conjuguée (indirecte), les solutions de benzoate de sodium additionnées d'urée ou de caféine sont de plus en plus répandues et semblent les plus commodes.

* La multiplicité des méthodes proposées pour le dosage séparé des fractions présentes dans le sérum suggère qu'aucune d'entre elles n'est vraiment satisfaisante, et les rapports présentés aux Journées de Biologie Clinique de Paris en Novembre 1957 prouvent en effet que l'accord entre les biologistes est loin d'être réalisé.

* * *

TRAVAUX PERSONNELS

Pour la clarté de l'exposé, ces travaux sont classés et présentés dans un ordre déterminé, mais il est bien évident que pour l'étude d'une question aussi complexe, il n'est pas possible de rapporter toutes les expériences dans l'ordre où elles ont été réalisées. C'est pourquoi nous serons parfois obligés de faire appel à des notions justifiées dans un paragraphe ultérieur.

Première partie

DOSAGE DE LA BILIRUBINE TOTALE

CHAPITRE I

PREPARATION DES SOLUTIONS TEMOINS

TITRES EN BILIRUBINE

L'analyse bibliographique nous a montré que les méthodes de dosage de la bilirubine totale dans le sérum sont très nombreuses, mais aussi que celles basées sur la réaction du pigment avec l'acide sulfanilique diazoté restent actuellement les plus utilisées, sans doute parce que la coloration obtenue est à la fois sensible et spécifique de la bilirubine dans le sérum sanguin.

Nous avons pu constater aussi que le premier point délicat est celui des solutions témoins nécessaires à l'étalonnage des photomètres. La diazoréaction (terme impropre mais habituel pour désigner la copulation de la bilirubine avec un diazoïque) présente en effet des caractéristiques variables selon la composition du milieu dans lequel elle est effectuée. Il paraît donc logique d'essayer de résoudre ce problème avant de commencer l'étude des différentes méthodes proposées pour le dosage.

La composition des témoins doit être aussi proche que possible de celle du milieu dans lequel s'effectue le dosage. Notre dessein a donc été de reconstituer "in vitro" le complexe bilirubine-sérumalbumine présent dans tout sérum normal ou ictérique.

Pour cela nous avons éliminé :

- tous les témoins empiriques (solutions de cobalt ou de rouge de méthyle)
- tous les témoins ne contenant pas de sérumalbumine.

Parmi les méthodes rapportées dans le chapitre précédent, trois seulement proposent des témoins susceptibles de répondre à nos exigences :

- * celle de JOUVENCEAUX et REVOL (75), dans laquelle la bilirubine est incorporée directement au sérum humain dans des conditions déjà précisées.
- * celle de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (29), dans laquelle on passe par l'intermédiaire d'une solution aqueuse alcaline.
- * celle de BARAC (10), qui utilise une solution aqueuse tamponnée de sérumbumine au lieu de sérum humain comme les précédentes.

A. Etude expérimentale et critique des différentes solutions témoins

JOUVENCEAUX et REVOL (technique exposée pages 31 et 32)

Au cours de plusieurs essais, nous avons pu faire les constatations suivantes :

- la solution de soude à 10 p. 100, indispensable pour dissoudre la bilirubine, détermine très vite dans le sérum un trouble important qui rend difficile l'observation des particules de pigment non dissoutes.
- ce trouble disparaît lors de la neutralisation par l'acide chlorhydrique, mais, dans le cas du sérum enrichi en bilirubine, il persiste une fine suspension de pigment qu'il est facile de mettre en évidence par centrifugation.

Nous pouvons donc dire que cette méthode ne permet pas d'obtenir une véritable solution. Nous ajouterons aussi qu'elle est de réalisation assez délicate et qu'elle demande une quantité importante de sérum humain frais.

CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (technique exposée p. 31)

Par opposition à la précédente, elle est de réalisation très facile, elle donne de véritables solutions de bilirubine, elle demande relativement peu de sérum.

Par contre, elle présente, à notre avis, deux inconvénients :

- le temps nécessaire à la préparation de la solution et des dilutions dans la soude 0,1 N est quelquefois suffisant pour que la coloration vire au brun-vert, ce qui laisse supposer un début d'oxydation.
- les sérums ictériques ainsi obtenus présentent un pH un peu trop élevé (en général voisin de 9).

BARAC (technique exposée page 32)

Nous avons utilisé une sérumalbumine d'origine placentaire qui donne avec le diazoréactif une légère coloration, et nous avons dû, pour cette raison, modifier la technique proposée par BARAC. A cette réserve près, nous avons pu constater que les témoins de cet auteur sont faciles à préparer et que les résultats obtenus sont très reproductibles.

Nous ferons cependant deux remarques :

- BARAC utilise des témoins dont la composition n'est pas celle du sérum humain.
- il n'est pas toujours commode de se procurer de la sérumalbumine.

Cette courte étude se proposait de déterminer notre choix parmi les différentes techniques proposées. Nous avons pu constater qu'aucune d'entre elles n'est exempte de critiques et qu'elles fournissent de plus des résultats assez divergents.

Aussi, nous inspirant des travaux précédents, avons-nous mis au point une méthode personnelle. Après l'avoir exposée, nous donnerons une étude comparative détaillée des solutions proposées comme témoins de bilirubine.

B. Recherches personnelles

Nous avons essayé de réaliser les trois conditions suivantes :

- * reconstituer une véritable solution de bilirubine dans du sérum humain
- * obtenir pour cette solution un pH compris entre 7 et 8
- * satisfaire ces deux conditions sans que le pigment soit altéré par les manipulations ou les réactifs utilisés.

1. OBTENTION D'UNE QUANTITE SUFFISANTE DE SERUM HUMAIN

L'utilisation de sérum humain peut présenter un inconvénient s'il faut, comme le préconisent JOUVENCEAUX et REVOL, du sérum frais provenant d'un même donneur sain. Pour cette raison, nous avons étudié les possibilités offertes par des mélanges constitués par les résidus d'analyses biologiques, courants dans tout laboratoire. A la lumière des comparaisons effectuées, nous pouvons dire qu'il est possible d'utiliser de tels résidus, en écartant ceux qui sont hémolysés ou déjà ictériques. Il suffit de conserver le mélange au réfrigérateur jusqu'à obtention du volume nécessaire et de le filtrer soigneusement sur papier au moment de l'emploi, car il se produit très souvent un léger précipité. Il importe cependant de ne pas attendre plus d'une semaine, car, passé ce délai, la clarification est quelquefois impossible.

2. PREPARATION D'UN SERUM ICTERIQUE ARTIFICIEL TITRE EN BILIRUBINE

L'étude critique de la méthode de JOUVENCEAUX et REVOL nous a montré qu'il est pratiquement impossible de dissoudre directement de la bilirubine dans du sérum. D'autre part, l'utilisation d'une solution aqueuse alcaline de pigment présente l'inconvénient majeur de modifier le pH du sérum. En employant cependant cet intermédiaire, nous nous sommes efforcés de limiter au strict nécessaire cette alcalinisation.

Pour simplifier l'exposé, nous donnerons tout d'abord le schéma général du processus suivi au cours de nos essais :

- * préparation d'une solution aqueuse titrant par litre 400 mg de bilirubine à l'état de sel de sodium.
- * addition à 1 volume de cette solution, de 4 volumes de sérum pour obtenir un témoin contenant par litre 80 mg de pigment ajouté artificiellement.

Seul le premier stade présente quelques difficultés, puisque le pH de cette solution aqueuse doit être le moins élevé possible. Pour parvenir à ce résultat, nous avons réalisé deux séries d'expériences :

- a) essais avec neutralisation de la solution aqueuse par addition ménagée d'acide chlorhydrique dilué (0,1N) pour corriger le pH.
- b) essais sans neutralisation.

Bien que seul le second procédé ait été retenu, nous décrirons également le premier, pour montrer sa difficulté, et aussi les raisons pour lesquelles il ne doit pas être utilisé.

a) Essais avec neutralisation de la solution aqueuse

Après des tâtonnements qu'il serait superflu de rapporter, notre choix s'est arrêté sur les proportions suivantes : 20 mg de bilirubine pour 10 ml de soude 0,1 N qui permettent de dissoudre le pigment sans difficultés.

Après avoir ajouté 20 ml d'eau distillée et 1 goutte de solution alcoolique de phénolphthaléine, nous avons neutralisé le mélange par de l'acide chlorhydrique 0,1 N en utilisant une burette. Il est en effet indispensable de déterminer au cours d'une première expérience la quantité d'acide à ajouter pour préparer la solution finale qui ne contiendra pas de phénolphthaléine.

Nous avons alors pu faire les constatations suivantes :

- Il est nécessaire de rester en milieu légèrement alcalin car le pigment précipite de sa solution dès que la phénolphthaléine se décolore.
- Il est difficile de voir à quel moment il faut arrêter l'addition de solution acide car, dans ce milieu très coloré, le virage n'est pas net. Il est souvent indispensable de réaliser plusieurs essais préliminaires.

Malgré ces difficultés, nous avons comparé les résultats fournis par différentes solutions ainsi préparées, et nous avons constaté que les droites d'étalonnage obtenues ne sont pas exactement superposables. Sachant d'autre part qu'il est possible d'oxyder la bilirubine en solution par simple acidification, nous pensons que les différences observées sont dues à la neutralisation. En effet, seul ce facteur est susceptible de varier d'une opération à l'autre (addition lente ou rapide de la solution acide, mode d'agitation et durée totale de la neutralisation).

Pour simplifier notre procédé assez délicat, nous avons étudié la solubilité de la bilirubine dans les solutions alcalines. En d'autres termes, nous avons cherché à dissoudre le pigment dans le minimum de soude, et ceci nous a permis de constater qu'il suffit, pour obtenir

rapidement la solution, de 2 ml de soude 0,1 N pour 20 mg de substance, si on ajoute en même temps 4 ou 5 ml d'eau distillée.

b) Essais sans neutralisation de la solution aqueuse

La constatation précédente nous permet de préparer facilement une solution aqueuse titrant 400 mg de bilirubine par litre dont l'alcalinité est inférieure à celle d'une solution de soude 0,004 N.

En mélangeant un volume de cette préparation et quatre volumes de sérum, nous obtenons toujours un pH inférieur à 8.

Ce procédé étant plus simple et plus exact que le précédent (en particulier reproductibilité excellente), nous l'avons adopté pour notre méthode définitive.

C. Méthode proposée

1°. Préparation d'une solution aqueuse à 400 mg de bilirubine par litre

Peser 20 mg de bilirubine (récente ou conservée dans de bonnes conditions) sur un verre de montre ou mieux sur un papier glacé car le pigment adhère au verre. Introduire la prise d'essai dans un ballon jaugé de 50 ml muni d'un bouchon de verre ou de caoutchouc.

Mesurer alors 2 ml de soude 0,1 N en entraînant la totalité de la bilirubine restée sur les parois et ajouter encore 4 à 5 ml d'eau distillée.

Boucher le ballon et agiter d'un mouvement circulaire en évitant la formation de mousse, toujours très difficile à éliminer ensuite, et très gênante pour compléter le volume au trait de jauge.

Au bout de 1 à 2 minutes, vérifier avec le plus grand soin que la dissolution est totale (pas de grains en suspension et liquide parfaitement limpide).

Compléter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée ajoutée par petites fractions en mélangeant prudemment pour éviter la mousse. Homogénéiser ensuite très soigneusement sans précautions particulières.

Cette solution ne se conserve pas et doit être utilisée immédiatement.

2°. Préparation de la solution-mère dans du sérum (Solution A)

Réaliser dans un tube à essais le mélange suivant:

Solution aqueuse à 400 mg par litre	2 ml (1 volume)
Sérum ou mélange de sérums	8 ml (4 ")

Ce sérum reconstitué contient donc par litre :

- la bilirubine apportée par la solution aqueuse
c'est-à-dire 80 mg
- la bilirubine apportée par le sérum que nous désignerons par x mg.

Sa concentration totale est donc de :

$80 + x$ mg par litre.

3°. Préparation des sérums témoins

Les dilutions de la solution A doivent être effectuées avec un sérum renfermant x mg de bilirubine par litre, c'est-à-dire qu'il faudra ajouter à 4 volumes de sérum pur, 1 volume de solution aqueuse isotonique.

Ces conditions sont réalisées par le mélange suivant ou Solution B :

Solution de chlorure de sodium à 9 g/litre :	3 ml
Sérum (le même que pour la solution A) :	12 ml

Pour obtenir des concentrations comprises entre 10 et 80 mg par litre, on utilisera les valeurs groupées dans le tableau suivant :

N° de la dilution	Solution A (en ml)	Solution B (en ml)	Concentration obtenue(mg/l)
1	0,4	2,8	10 + x
2	0,8	2,4	20 + x
3	1,2	2	30 + x
4	1,6	1,6	40 + x
5	2	1,2	50 + x
6	2,4	0,8	60 + x

Avec les volumes indiqués ci-dessus, l'étalonnage d'un photomètre est réalisable avec seulement 21 ou 22 ml de sérum ou de mélange de sérums, ce qui nous semble possible dans tout laboratoire.

Signalons dès maintenant que les dilutions précédentes peuvent être conservées au moins 48 heures au réfrigérateur sans altération du pigment. Cependant, comme il peut se produire une légère floculation (lorsqu'on utilise un mélange de sérums), nous conseillons de construire sans attendre la courbe d'étalonnage.

Si l'on veut obtenir une gamme plus étendue de témoins (pour une microméthode par exemple), il suffit de préparer une Solution A plus concentrée et de modifier la composition de la Solution B et les proportions indiquées dans le tableau ci-dessus.

Pour la construction de la courbe d'étalonnage, la réaction colorée choisie pour le dosage sera pratiquée sur chacune des six dilutions, ainsi que sur la Solution B, qui représente la quantité de bilirubine apportée par le sérum.

Cette quantité, que nous avons désignée par x mg par litre, doit être déduite de tous les témoins pour obtenir les correspondances exactes entre les graduations de l'appareil utilisé et la bilirubine ajoutée artificiellement (10, 20, ... mg par litre), correspondances nécessaires pour construire la courbe d'étalonnage.

4°. Discussion

Les témoins obtenus sont parfaitement limpides, la centrifugation montre qu'il n'y a pas de particules en suspension.

Le pH du sérum utilisé au départ est peu modifié, l'augmentation constatée est comprise entre 0,1 et 0,2 unités de l'échelle pH, ce qui est négligeable dans ce cas particulier.

D'après les déterminations de BARAC (10), 1 g de sérumalbumine peut fixer sous forme de complexe 21 mg de bilirubine. Le calcul montre que notre témoin le plus riche en pigment renferme une proportion de sérumalbumine 7 à 8 fois plus importante.

La réaction qualitative d'HIJMANS VAN DEN BERGH pratiquée sur ces sérums reconstitués met en évidence une diazoreaction directe légèrement positive, ce qui peut s'expliquer d'après les travaux de WESTPHAL et GEDIGK (111) et de CORA (42), puisque nos témoins ne renferment que 80 p. 100 de sérum pur. Cette propriété n'est pas gênante pour l'étalonnage d'un électrophotomètre.

L'alcool méthylique ajouté à ces témoins, dans les conditions indiquées par MALLOY et EVELYN (79), conduit à des résultats assez décevants; les liquides sont presque toujours troubles lorsque le sérum de base est un mélange conservé quelques jours au réfrigérateur. Pour étudier la méthode décrite par ces auteurs, nous avons dû nous procurer du sérum frais provenant d'un même donneur et vérifier que ce sérum permettait d'obtenir un mélange limpide dans les conditions de la réaction.

Les réactifs dérivés de celui de JENDRASSIK, par contre, se comportent de la même façon avec tous les sérums, naturels ou reconstitués; ils nous ont donné toute satisfaction.

Après l'étude des propriétés générales de nos témoins, nous pensons qu'ils conviennent pour un étalonnage, cette opinion étant encore confirmée par les remarques suivantes :

* L'oxydation de la bilirubine est évitée puisque nous la protégeons avec la sérumalbumine du sérum (comme l'ont montré les travaux de BARAC déjà cités).

* L'addition d'un volume de solution aqueuse à quatre volumes de sérum pur n'est pas un inconvénient pour la préparation de témoins titrés en pigment. Nous montrerons dans un chapitre ultérieur que la dilution d'un sérum ictérique avec une solution de chlorure de sodium à 9 g par litre n'introduit aucune perturbation dans le dosage de la bilirubine totale.

* Plusieurs gammes de témoins préparées avec des solutions aqueuses et des mélanges de sérums différents, ont été traitées selon la même méthode de dosage de la bilirubine totale. Toutes nous ont donné, pour un électrophotomètre déterminé, une même droite d'étalonnage et nous pensons être en droit de conclure à une bonne reproductibilité des résultats.

Au terme de cette discussion, nous pensons que nos témoins répondent à toutes les exigences requises pour l'étalonnage d'un photomètre en vue du dosage de la bilirubine totale du sérum.

D. Etude comparative des méthodes d'étalonnage

Cette étude porte essentiellement sur les sérums reconstitués proposés, c'est-à-dire les méthodes de BARAC, DE JOUVENCEAUX et REVOL, de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT et notre technique personnelle. Nous avons également confronté les résultats obtenus à ceux fournis par les procédés utilisant comme témoins des solutions aqueuses ou alcool-chloroformiques.

Pour juger de la valeur relative de ces différentes méthodes d'étalonnage, nous avons utilisé dans tous les cas la même technique de dosage de la bilirubine totale, celle que nous avons adoptée après les essais qui seront décrits dans le chapitre suivant. Nous avons de plus, avec chaque série de témoins, construit la courbe d'étalonnage correspondante, ce qui nous a permis de comparer plus exactement les résultats qu'avec des concentrations isolées. Enfin, cette manière d'opérer nous place dans les conditions habituelles d'un étalonnage et fait en particulier intervenir un facteur important : le délai d'utilisation des solutions de bilirubine dont certaines s'altèrent rapidement comme nous le savons.

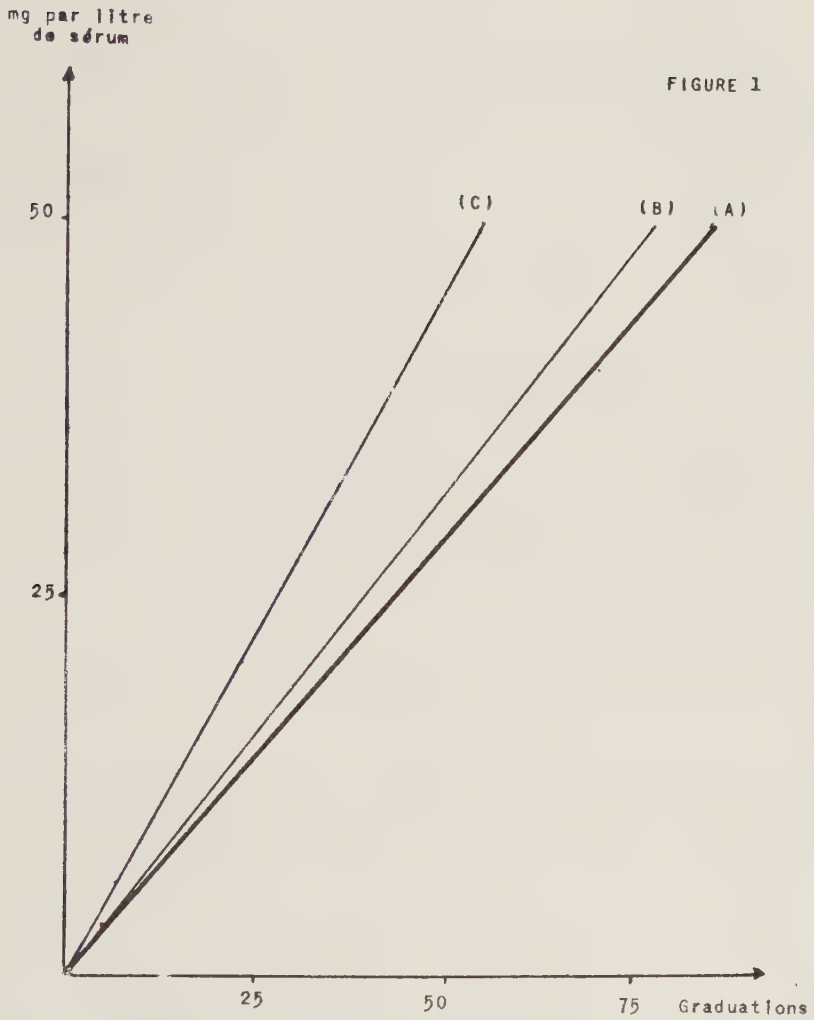
1°. SÉRUMS ICTÉRIQUES RECONSTITUÉS

* Technique de BARAC

Nous avons obtenu, avec les témoins de cet auteur des résultats absolument superposables à ceux fournis par nos sérums reconstitués. Pour cette raison, dans les comparaisons qui vont suivre, nous avons adopté comme références la droite d'étalonnage unique fournie par ces deux procédés différents. Nous avons, à l'aide de cette droite, déterminé les concentrations apparentes des autres témoins de bilirubine proposés.

* Technique personnelle avec neutralisation partielle de la solution aqueuse

Les résultats consignés dans la figure 1 montrent que le témoin correspondant à 40 mg par litre renferme seulement 36 mg de pigment réagissant avec le diazoréactif. Ceci prouve qu'au cours de la neutralisation partielle de la solution aqueuse, nous avons détruit, sans doute par oxydation, 10 p. 100 de la bilirubine.



(A) Droite considérée comme référence

(B) Méthode personnelle avec neutralisation partielle
de la solution aqueuse.

(C) Méthode de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT.

* Technique de JOUVENCEAUX et REVOL

Plusieurs essais nous ont donné des résultats peu concordants, et dans le témoin contenant 40 mg par litre, nous n'avons jamais retrouvé plus de 20 mg par litre de bilirubine "diazotable". Utilisant d'autre part des témoins préparés selon notre technique, mais traités selon la méthode de dosage de JOUVENCEAUX et REVOL, nous avons constaté que la loi de BEER-LAMBERT n'est pas vérifiée au-delà de 150 mg par litre, alors que les auteurs indiquent 300 mg comme limite supérieure.

Un tel écart ne peut provenir des électrophotomètres de Meunier comme nous l'avons constaté en comparant la sensibilité de quatre appareils différents. Il faut donc admettre que le mode de préparation indiqué par les auteurs précédents ne conserve que la moitié environ du pigment. Comme les auteurs corrigent le pH de leur solution-mère avec de l'acide chlorhydrique à 7 p. 100, ces résultats constituent un argument supplémentaire contre toute tentative de neutralisation.

* Technique de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT

Rappelons que ces auteurs utilisent une gamme de solutions de bilirubine dans la soude décijnormale mélangées ensuite à du sérum humain pour leur méthode dite "oxydo-réaction". Bien que dans ce cas, le dosage de la bilirubine ne soit pas effectué suivant une diazoréaction, nous avons étudié ce type de témoins, puisqu'ils sont constitués de complexes avec la sérumalbumine.

La droite d'étalonnage obtenue est rapportée dans la figure 1 sur laquelle il est possible de relever les différences de densités optiques. Pour reprendre le même exemple du témoin contenant 40 mg par litre, on peut voir que la solution de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT ne renferme que 25,5 mg de bilirubine réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté.

Ces témoins, pas plus que les précédents, ne doivent donc être utilisés pour l'étalonnage d'un électrophotomètre. La différence relevée ici avec la droite prise comme référence peut provenir, soit du milieu trop alcalin, soit de l'altération du pigment en solution aqueuse au cours des manipulations.

2°. SOLUTIONS AQUEUSES DE BILIRUBINATE DE SODIUM

Ce procédé est conseillé par un certain nombre d'auteurs, et en particulier en France par POLONOVSKI et COLIN (88). Nous avons effectué les mesures sur des dilutions de la solution-mère à 400 mg par litre telle que nous la préparons.

Ces solutions s'altèrent à l'air et à la lumière, mais en opérant très rapidement, nous avons pu faire les constatations suivantes :

- la densité optique est plus faible qu'en présence de sérumalbumine, fait déjà signalé par KILCHLING et KUHN (76) en 1951.

- la densité optique est variable selon l'ordre dans lequel on mélange les différents réactifs (solution de caféine et diazoréactif). Il semble en effet, une fois de plus, que l'acidification des solutions aqueuses (ici par le diazoréactif), entraîne une destruction du pigment dissous, puisque la densité optique est plus faible si la solution de caféine est ajoutée en dernier lieu.

Les droites d'étalonnage obtenues par ce procédé sont reproduites dans la figure 2. On peut constater que le témoin à 40 mg par litre ne renferme, dans les meilleures conditions, que 35 mg de pigment "diazotable".

L'emploi des solutions aqueuses est donc à déconseiller, au moins avec une méthode de dosage utilisant des réactifs "révélateurs" à base de benzoate de sodium et de caféine, ce qui est le cas de la technique proposée par POLONOVSKI et COLIN. Nous insisterons encore sur l'altération très rapide de ces témoins à l'air et à la lumière, ce qui risque de conduire à des résultats encore plus erronés si les différentes phases de l'étalonnage ne sont pas conduites rapidement. Rappelons enfin qu'il n'est pas possible de stabiliser ces témoins avec de l'acide ascorbique (10).

3°. SOLUTIONS ALCOOLO-CHLOROFORMIQUES DE BILIRUBINE

Ce procédé a été préconisé par MALLOY et EVELYN (79), puis repris sous une forme un peu différente par POWELL (92). Dans les deux cas, une solution-mère de pigment dans le chloroforme est diluée avec de l'alcool, les dilutions étant ensuite additionnées de diazoréactif. POWELL se contente d'une solution qui correspond dans sa méthode à une concentration de 40 mg de bilirubine par litre de sérum.

Nous avons repris ces techniques en modifiant seulement les volumes d'alcool utilisés afin de nous placer dans les conditions de notre méthode de dosage. La courbe obtenue pour l'étalonnage est représentée dans la figure 2.

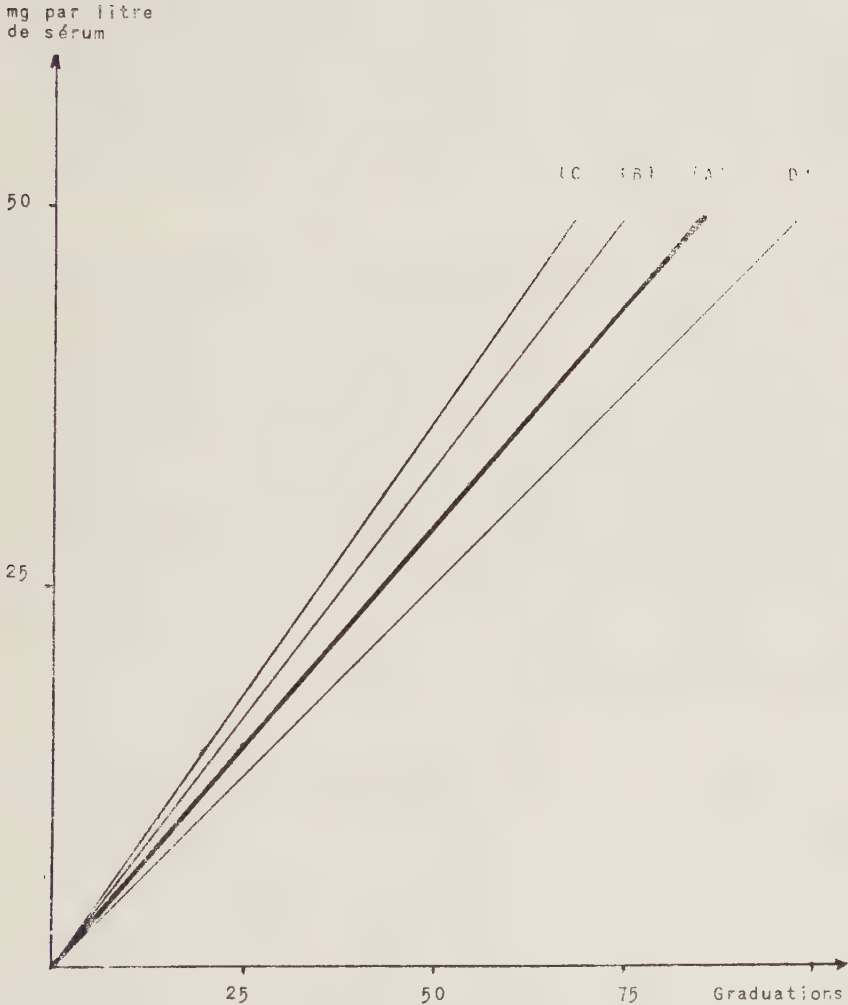
L'examen de ce graphique permet de constater qu'une même quantité de bilirubine donne une réaction plus intense en présence d'alcool. Par rapport à la droite prise comme référence, la solution à 40 mg par litre semble en renfermer 46 mg, ce qui constitue un écart de 15 p. 100.

Ceci nous permet d'affirmer qu'avec les "révélateurs" choisis dans notre expérience, il n'est pas possible d'étalonner un photomètre à l'aide de solutions alcoolo-chloroformiques de bilirubine. Comme nous montrerons ci-dessous que l'alcool méthylique donne la même densité optique que les solutions de caféine, ce mode d'étalonnage est donc à proscrire.

Ces résultats confirment ceux de JIRSA et JIRSOVA (74), qui montrent l'influence de l'alcool sur la densité optique, et mettent en évidence une erreur systématique dans la méthode de MALLOY et EVELYN. Il était donc intéressant de vérifier si l'écart précédent se retrouve dans la technique utilisant l'alcool méthylique comme "révélateur" de la bilirubine non conjuguée du sérum.

Pour effectuer cette comparaison, nous avons traité une même série de témoins reconstitués par les solutions de caféine et par l'alcool méthylique. Tenant compte des

FIGURE 2



(A) Droite considérée comme référence

(B) Solutions aqueuses (diazoréactif ajouté après la solution de caféine)

(C) Solutions aqueuses (diazoréactif ajouté avant la solution de caféine)

(D) Solutions alcool-chloroformiques.

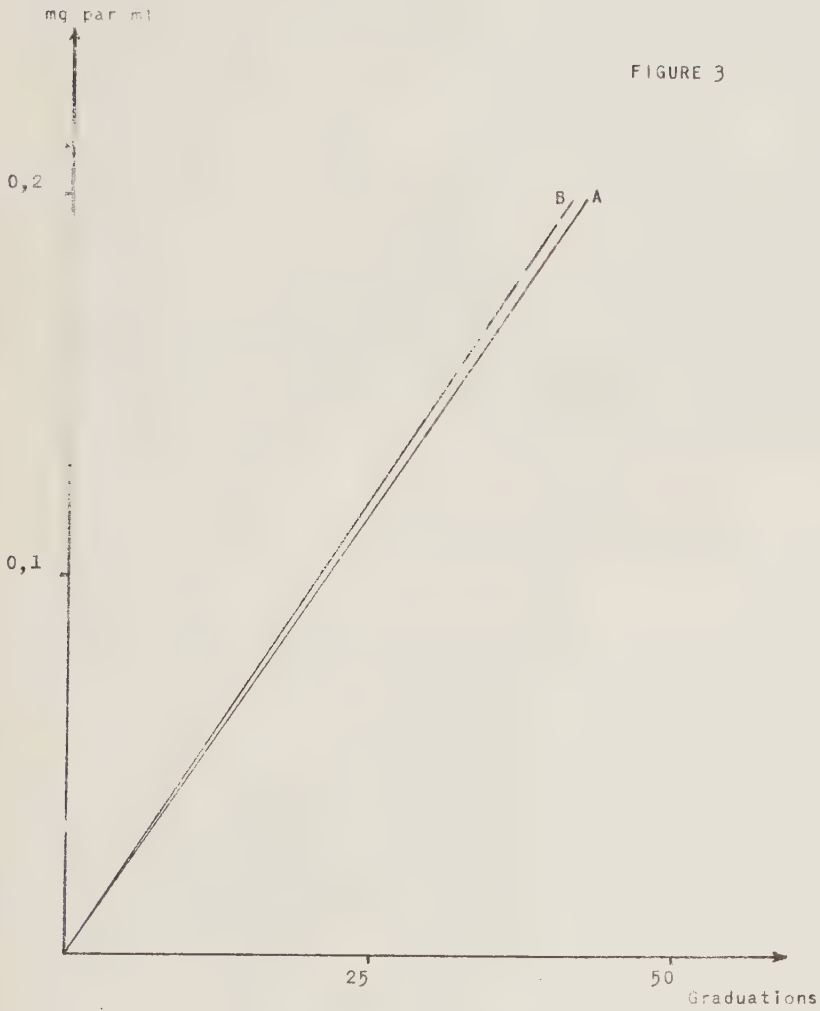
dilutions différentes utilisées dans les deux méthodes (respectivement 1/12,5 et 1/25), nous avons porté sur le même graphique (figure 3) les résultats obtenus. On peut constater que les deux procédés donnent des densités optiques très voisines, et ceci nous permet de formuler des conclusions plus générales sur les méthodes d'étalonnage, valables pour l'ensemble des techniques de dosage de la bilirubine du sérum sans précipitation des protéines.

4°. CONCLUSIONS SUR L'ETUDE COMPARATIVE DES METHODES D'ETALONNAGE

Nous rappelons que, dans l'étude précédente, nous avons pris comme référence la droite unique fournie à la fois par nos témoins et par ceux de BARAC (10), ces derniers n'étant pas préparés avec du sérum humain mais avec une solution de sérumalbumine tamponnée à pH = 7,31. Par rapport à cette référence, nous avons étudié les autres témoins proposés par différents auteurs.

Le tableau ci-dessous résume nos résultats pour des témoins renfermant 40 mg de bilirubine par litre :

METHODE	PRINCIPE	CONCENTRATION APPARENTE
Chabrol, Boszormenyi et Fallot	sérum humain	25,5 mg/l.
Jouveneaux et Revol	sérum humain	moins de 20 mg/l.
Polonovski et Colin	solution aqueuse	32 à 35 mg/l.
Malloy et Evelyn	solution alcoolochloroformique	46 mg/l.



(A) Droite obtenue avec les solutions de caféine

(B) Droite obtenue avec l'alcool méthylique

Ces résultats montrent l'importance fondamentale du choix des témoins pour l'étalonnage des appareils de mesure destinés au dosage de la bilirubine du sérum sanguin. Il semble bien qu'on puisse rattacher à l'utilisation d'une solution défectueuse de pigment, certains écarts relevés entre les examens pratiqués dans des laboratoires différents.

Pour résoudre ce problème, nous conseillons, soit les solutions préconisées par BARAC (10) - elles utilisent de la sérumalbumine pure -, soit celles que nous avons mises au point à partir de quelques ml de sérum humain. Les résultats fournis par ces deux types de témoins sont, on l'a vu, rigoureusement identiques lorsqu'on leur applique la même méthode de dosage.

CHAPITRE II

CHOIX D'UNE METHODE PHOTOMETRIQUE

La lecture des différents travaux nous a montré que les auteurs s'orientent actuellement vers les méthodes sans précipitation des protéines du sérum, utilisant des réactifs "révélateurs" à base de benzoate de sodium et de caféine ou d'urée.

Ces réactifs présentent en effet deux avantages :

- ils permettent des dosages précis même sur des sérums normaux
- ils sont beaucoup plus facile à utiliser que l'alcool méthylique qui donne souvent des mélanges troubles.

Parmi les nombreuses formules proposées, nous avons choisi les suivantes qui paraissaient, à la lecture de divers travaux, donner les meilleurs résultats. Quelques expériences réalisées avec l'alcool méthylique de MALLOY et EVELYN nous ont permis d'en constater les inconvénients et, pour cette raison, nous n'avons pas étudié en détail cette méthode.

Formules utilisées :

- * 1. POLONOVSKI et COLIN (88)
- * 2. WITH utilisée par BENARD, GADJOS et TISSIER (16)
- * 3. POWELL (92)
- * 4. JOUVENCEAUX et REVOL (75)

(la composition exacte de ces réactifs a été donnée pages 27 et 28).

A. Etude de la formule du diazoréactif

L'étude bibliographique, et le travail de POWELL en particulier, montre que, dans certaines conditions, l'acide benzoïque précipite dans le milieu réactionnel et rend impossible toute mesure colorimétrique. Devant ce fait, nous avons étudié deux formules de solution d'acide sulfanilique proposées par l'école d'HIJMANS VAN DEN BERGH, formules qui varient seulement par leur pH. Il est en effet logique de supposer que le trouble obtenu provient de l'acidification du milieu par le diazoréactif.

Nous avons comparé les deux formules suivantes :

Formule I :	Acide sulfanilique	1 g
	Acide chlorhydrique <u>pur</u>	15 ml
	Eau distillée	QSP 1 litre

Formule II :	Acide sulfanilique	1 g
	Acide chlorhydrique <u>à 25 p.100</u>	15 ml
	Eau distillée	QSP 1 litre

Dans les essais préliminaires sur le diazoréactif, nous avons conservé les proportions généralement utilisées dans ce groupe de méthodes :

Sérum	1 volume
Diazoréactif	1 volume
Réactif "révélateur"	10 volumes

Par la suite, pour des raisons de commodité et pour tenir compte de la sensibilité de la réaction, nous avons adopté les valeurs suivantes, légèrement différentes.

Sérum	0,4 ml
Diazoréactif	0,6 ml
Réactif "révélateur"	4 ml

Tous les résultats rapportés dans la suite de ce travail ont été obtenus en utilisant ces dernières proportions.

Formule I

Nous avons pu constater, lors du mélange du diazoréactif et du réactif "révélateur", qu'il se produit toujours une précipitation passagère d'acide benzoïque disparaissant en général par agitation. Le meilleur réactif parmi ceux que nous avons utilisés semble celui de WITH, sans doute parce qu'il contient de l'acétate de sodium, jouant le rôle de substance tampon.

Cependant, dans 10 p. 100 des cas environ, le précipité d'acide benzoïque persiste, même avec le réactif de POWELL qui permet, selon son auteur, de pallier cet inconvénient. Pour ces quelques sérums, toute mesure colorimétrique est absolument impossible.

Formule II

Avec cette formule, au contraire, nous n'avons jamais constaté de précipitation, même temporaire d'acide benzoïque. Le liquide final est toujours parfaitement limpide.

Nous avons comparé, lorsque cela était possible, les densités optiques obtenues sur le même sérum avec les deux formules de diazoréactif. Les résultats étant absolument identiques, nous avons conservé la seconde formule.

B. Etude systématique des réactifs "révélateurs"

1. MELANGES DE BENZOATE DE SODIUM ET D'UREE

La formule de JOUVENCEAUX et REVOL présente quelques inconvénients, dûs, sans doute, à sa viscosité élevée. Il faut en effet agiter très soigneusement le mélange réactionnel, et il se produit alors dans le milieu de fines bulles d'air qui remontent lentement à la surface.

Pour une mesure correcte, il est nécessaire de laisser reposer le liquide, dans la cuve même de l'électrophotomètre, et ceci interdit presque l'emploi de cette technique pour les dosages en série.

Nous devons noter cependant que la coloration atteint rapidement sa densité optique maximum, et reste stable après

la troisième minute (ce laps de temps étant nécessaire pour permettre aux bulles d'air de s'élever au-dessus du faisceau lumineux).

La formule de POWELL, que nous avons plus longuement étudiée, ne présente pas l'inconvénient précédent, mais nous avons remarqué, par contre, que la coloration n'est pas stable dans tous les cas. Dans 20 à 25 p. 100 des essais on note, en effet, soit un virage du rose au mauve ou au brun en deux à trois minutes, soit une disparition complète de toute coloration en un temps aussi court. Les formules à base de caféine nous ayant donné toute satisfaction, nous n'avons pas cherché les causes de ce changement de coloration.

Nous ajouterons cependant que nous avons obtenu, en règle générale, des résultats un peu plus faibles avec la formule de POWELL qu'avec celle de JOUVENCEAUX et REVOL.

2. MELANGES RENFERMANT DE LA CAFEINE

Les formules 1 et 2 rapportées au début de ce chapitre nous ont donné des résultats très concordants, la coloration atteignant presque instantanément son maximum d'intensité. Le procédé indiqué par BENARD et ses collaborateurs (réactif de WITH dilué au 1/4) fournit, au contraire, des résultats plus faibles dès que la concentration en bilirubine dans le sérum dépasse 20 mg par litre environ (la lecture étant cependant effectuée au bout de 10 minutes selon la méthode des auteurs). Il semble donc, dans ce dernier cas, que la quantité de réactif "révélateur" soit insuffisante, et, bien que le mode d'étalonnage ne soit pas indiqué par les auteurs, ceci explique peut-être pourquoi on peut, avec cette technique, obtenir une droite jusqu'à 100 mg de bilirubine par litre de sérum.

Dans le tableau de la page suivante, nous avons réuni comparativement les résultats obtenus sur une série de sérums avec les formules 1 et 2 à base de caféine.

On peut constater que les écarts sont minimes : ils ne dépassent pas la limite des erreurs habituelles de toute lecture photométrique et se produisent tantôt dans un sens, tantôt dans l'autre. De plus, il n'existe aucune relation entre les écarts relevés et la bilirubinémie totale; pour cette raison, nous n'avons pas calculé l'erreur relative.

N ^o des Sérums	Formule 1	Formule 2	Ecart en valeur absolue(mg/litre)
1	7,5	8	+ 0,5
2	41	41,5	+ 0,5
3	23	23,5	+ 0,5
4	21	20	- 1
5	8	8	0
6	11,5	11	- 0,5
7	25	25,5	+ 0,5
8	11	11,5	+ 0,5
9	23,5	23,5	0
10	12,5	12,5	0
11	11,5	12	+ 0,5
12	8	7	- 1
13	3,5	3	- 0,5
14	11	11	0
15	17,5	17,5	0
16	48	48	0
17	29,5	31,5	+ 2
18	40,5	41	+ 0,5
19	15	15,5	+ 0,5
20	34	34,5	+ 0,5
21	20	20	0
22	16	17	+ 1

3. RESULTATS

Parmi les cinq formules expérimentées, celles de POWELL et de BENARD semblent à éliminer puisque, comme nous l'avons rapporté, elles fournissent des valeurs plus faibles.

Par contre, les trois autres conduisent à des résultats pratiquement identiques, comme il est possible de le constater dans le tableau ci-dessous, concernant une gamme de sérums témoins reconstitués (en graduations de l'appareil de MEUNIER) :

Concentration mg p. litre	Solutions de caféine (Polonovski ou With)	Benzoate - Urée (Jouvencaux)
10	12,5	12
20	25,5	25
30	38,5	38,5
40	49	50

A la suite de ces résultats, nous avons éliminé la formule de JOUVENCEAUX et REVOL, trop délicate à utiliser pour des dosages en série, comme nous l'avons dit précédemment.

D'autre part, bien que les deux réactifs à base de caféine soient équivalents, nous avons en définitive adopté celui de WITH (qui renferme de l'acétate de sodium) pour la raison suivante : il est seul utilisable dans la méthode de dosage de la bilirubine non conjuguée du sérum que nous proposerons dans la deuxième partie de ce travail.

Nous étudierons maintenant en détail les conditions d'utilisation de ce réactif de WITH pour le dosage de la bilirubine totale du sérum.

C. Etude de la réaction obtenue avec le réactif de WITH

Rappelons que dans toutes nos expériences, nous avons utilisé les proportions suivantes :

Sérum	0,4 ml
Diazoréactif	0,6 ml
Réactif de WITH	4 ml

Dans l'exposé de nos résultats, nous étudierons successivement :

- l'analyse spectrophotométrique de la coloration
- l'importance du témoin de sérum et de réactifs
- la stabilité de la coloration en fonction du temps
- la reproductibilité des résultats
- la sensibilité de la réaction
- l'influence de la dilution préalable des sérums très ictériques
- l'importance de la quantité de diazoréactif utilisée.

* * *

1. ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE LA COLORATION

Longueur d'onde (en m μ)	Densité optique	
	après 10 mm	après 20 mm
500	0,11	
510	0,25	0,23
520	0,31	0,31
530	0,35	0,345
540	0,36	0,355
550	0,36	0,36
560	0,34	0,34
570	0,305	0,30
580	0,245	
590	0,20	
600	0,15	

Avec les appareils ne permettant pas de séparer une radiation de longueur d'onde déterminée, on choisira donc un filtre dont le maximum de transmission se situe entre 530 et 560 m μ .

2. IMPORTANCE DU TEMOIN DE SERUM ET DE REACTIFS

La plupart des auteurs conseillent de réaliser un témoin en remplaçant le diazoréactif, soit par la solution d'acide sulfanilique, soit par une solution d'acide chlorhydrique de même concentration.

On peut se demander si un tel témoin n'est pas dans le dosage une cause d'erreur par défaut, puisque la coloration jaune du sérum, si elle est due à la bilirubine,

doit disparaître au cours de la "diazotation". Nous pensons, pour les raisons suivantes, qu'il est indispensable de préparer ces témoins :

- cette façon d'opérer ne peut introduire une cause d'erreur puisque dans l'étalonnage, comme dans les dosages ultérieurs, les valeurs portées sur la courbe résultent toujours de la différence entre deux densités optiques : celles obtenues avec un même sérum, traité ou non par le diazoréactif.

- si l'on compare les témoins de réactifs préparés avec des sérums normaux ou ictériques, on constate que dans les conditions précisées ci-dessus (longueur d'onde comprise entre 530 et 560 m μ), les valeurs obtenues ne varient pas proportionnellement au taux de bilirubine; les écarts relevés d'un échantillon à un autre paraissent simplement liés à la plus ou moins grande limpidité des sérums utilisés.

Par conséquent, dans tous les essais que nous rapportons, nous avons réalisé pour chaque sérum un témoin en remplaçant le diazoréactif par la solution d'acide sulfanilique ou solution A d'HIJMANS VAN DEN BERGH.

3. STABILITE DE LA COLORATION EN FONCTION DU TEMPS

Sur le même sérum nous avons effectué quatre essais différents dont nous avons consigné les résultats dans le tableau suivant (expression en mg par litre de sérum) :

Temps en minutes	1	2	5	10	15	75
Essai 1	48,5	48	48	49	48,5	48,5
Essai 2	48,5	48,5	48	48,5	48	48,5
Essai 3	48	48,5	48,5	49	49	48
Essai 4	48	48	48,5	48	48	49

La réaction est donc stable pendant un temps assez long, mais il paraît cependant préférable de ne pas attendre plus de 15 minutes car la coloration rose vire progressivement à l'orangé. Dans certains cas ceci peut en effet apporter quelques erreurs, surtout si la longueur d'onde utilisée se rapproche de 530 m μ .

4. REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS

Nous avons vu, au paragraphe précédent, que plusieurs dosages sur le même sérum donnent des résultats pratiquement identiques, ce que nous pouvions déjà supposer après les comparaisons effectuées entre les deux solutions de caféine.

Sur un autre sérum, dont nous avons pu nous procurer une quantité suffisante, nous avons pratiqué sept mesures et tous les résultats furent compris entre 39 et 40 mg par litre.

Il semble donc que les écarts relevés soient dûs aux seules erreurs de lecture colorimétrique sur l'électrophotomètre utilisé.

Nous avons également étudié l'influence possible de l'ordre dans lequel les réactifs sont ajoutés au sérum, c'est-à-dire :

- soit diazoréactif puis solution de caféine
- soit solution de caféine puis diazoréactif.

Sans rapporter une liste fastidieuse de résultats, nous pouvons affirmer que cet ordre est sans influence sur l'intensité de la réaction colorée. On peut noter toutefois qu'avec certains sérums, et lorsque le diazoréactif est ajouté le dernier, il faut deux à trois minutes pour que la coloration atteigne son maximum.

Cette caractéristique permet donc de coupler la réaction qualitative d'HIJMANS VAN DEN BERGH et le dosage de la bilirubinémie totale dans la pratique courante.

On peut opérer ainsi :

- * mesurer dans deux tubes 0,4 ml de sérum pur et ajouter
 - dans le premier 0,6 ml de solution d'acide sulfanilique
 - dans le deuxième 0,6 ml de diazoréactif.
- * mélanger, attendre 40 secondes et noter la réaction obtenue

- * ajouter enfin dans chacun des deux tubes 4 ml de solution de caféine pour le dosage de la bilirubine totale.

Dans les conditions ci-dessus, la proportion de sérum est celle préconisée par HIJMAN VAN DEN BERGH c'est-à-dire 2 volumes sur 5. Nous insisterons sur le fait que ce mode opératoire n'est possible qu'avec du sérum ictérique non dilué. Certains travaux (42, 111) ont montré que la dilution augmente l'intensité de la réaction directe et peut même la faire apparaître; nous avons pu le vérifier, et nous le montrerons dans un chapitre ultérieur. Ce détail est important car nous verrons que le dosage n'est souvent possible que sur un sérum préalablement dilué avec un soluté isotonique.

5. SENSIBILITE DE LA REACTION

Tous les auteurs ont constaté que la coloration avec ce groupe de méthodes utilisant des réactifs "révélateurs" à base de caféine est très sensible. Dans les conditions où nous opérons, 1 mg de bilirubine par litre de sérum représente environ 1 division du tambour d'un électrophotomètre de type MEUNIER ou ELECTROSYNTHESE, soit en densité optique 0,003 environ. Ceci correspond à l'écart moyen relevé entre deux mesures consécutives sur le même échantillon.

Cette sensibilité explique que dans notre méthode la loi de BEER-LAMBERT ne soit pas vérifiée au-delà de 50 mg de bilirubine par litre de sérum (cette valeur représentant une moyenne entre nos essais réalisés sur cinq appareils différents).

En pratique, il sera donc nécessaire de diluer au préalable les sérums très ictériques avant de procéder au dosage. Cette dilution est réalisée dans une solution de chlorure de sodium à 9 g par litre et, avec un peu d'habitude, on parvient aisément à obtenir par simple appréciation visuelle, une concentration voisine de 30 à 40 mg par litre.

6. INFLUENCE DE LA DILUTION PREALABLE DES SERUMS TRES ICTERIQUES

Sur des sérums très riches en pigment, nous avons pratiqué plusieurs dilutions à des taux différents, et nous avons comparé les résultats obtenus. Nous pouvons affirmer que cette pratique n'introduit aucune cause d'erreur, la précision du dosage étant seulement moins bonne, puisque l'écart standard sur la mesure est multiplié par le taux de la dilution utilisée.

Nous donnons ci-dessous quelques valeurs obtenues sur un même sérum :

Dilution réalisée	mg par litre dans la dilution	mg par litre de sérum
1/6	47,5	285
1/8	36,5	292
1/10	29	290

Résultat moyen : 289 mg par litre

Erreur relative : respectivement 1,38, 1,12 et 0,34 p.100

Ceci nous paraît d'autant plus satisfaisant que des dilutions aussi importantes sont peu fréquentes. Cependant, dans tous les cas où il sera nécessaire d'obtenir une grande précision, il faudra faire deux dilutions différentes et prendre la moyenne.

7. IMPORTANCE DE LA QUANTITE DE DIAZOREACTIF UTILISEE

Pour essayer d'augmenter la précision des dosages effectués sur des sérums normaux, nous avons réalisé comparativement les expériences suivantes :

a) <u>technique habituelle</u>	TEMOIN	REACTION
Sérum	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	-
Diazoréactif	-	0,6 ml
Solution de caféine	4 ml	4 ml

b) technique avec trois fois moins de diazoréactif

	TEMOIN	REACTION
Sérum	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,2 ml	—
Diazoréactif	—	0,2 ml
Solution de NaCl à 9 g par litre	0,4 ml	0,4 ml
Solution de caféine	4 ml	4 ml

Nous avons pu constater que pour des concentrations inférieures à 30 mg de bilirubine par litre de sérum, les résultats sont identiques. Pour des valeurs plus importantes, par contre, la quantité de diazoréactif semble insuffisante.

Il est donc possible d'utiliser ce procédé pour sensibiliser les dosages lorsque les teneurs en pigment sont faibles; nous en userons en particulier pour les sérums renfermant très peu de bilirubine non oxydable.

Le réactif de WITH fournit donc, dans des conditions expérimentales particulièrement faciles à réaliser, une coloration à la fois sensible, stable et reproductible. Sur ce principe, nous avons pu mettre au point la méthode de dosage de la bilirubine sérique totale que nous **exposons** en détail ci-dessous.

* * *

D. Technique proposée

1°. REACTIFS

1. Solution d'acide sulfanilique (Solution A)

Acide sulfanilique	1 g
Acide chlorhydrique à 25 p.100 v/v	15 ml
Eau distillée	100 à 200 ml

Dissoudre complètement en agitant (ce qui peut demander plusieurs jours si on ne dispose pas d'un agitateur mécanique).

Transvaser dans un ballon jaugé de 1 litre, rincer et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

2. Solution de nitrite de sodium (Solution B)

Nitrite de sodium	0,50 g
Eau distillée	QSP 100 ml

Ce réactif altérable, doit être renouvelé chaque semaine.

3. Diazoréactif

Il se prépare par mélange extemporané des solutions A et B dans les proportions suivantes :

Solution B	0,3 ml
Solution A	10 ml

Il doit être rejeté 30 minutes après sa préparation.

4. Solution de caféine

Introduire dans un ballon jaugé de 1 litre :

Benzoate de sodium purifié PROLABO (27.694)	75 g
Eau distillée	400 ml environ

Dissoudre puis ajouter :

Caféine finement pulvérisée	50 g
Acétate de sodium	125 g

Dissoudre et compléter le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.

La dissolution doit toujours s'opérer à froid car il apparaît souvent lors du chauffage une coloration jaune. Il faut employer obligatoirement du benzoate purifié car quelques essais avec d'autres produits furent très décevants, la coloration de l'azoïque disparaissant en quelques minutes.

Il est commode d'ajouter la caféine par petites portions, car la dissolution est beaucoup plus rapide.

5. Solution de chlorure de sodium

Solution isotonique habituelle à 9 g par litre.

Remarque importante

Tous les réactifs doivent être filtrés avec le plus grand soin.

2°. MODE OPERATOIRE

a) Pour la construction de la courbe d'étalonnage

Sur la solution B et sur chacun des 6 témoins de bilirubine décrits pages 58 et 59 (la solution B représente la bilirubine apportée par le sérum humain), on pratique la réaction suivante :

	TEMOIN	REACTION
Solution B ou sérum reconstitué	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	-
Diazoréactif	-	0,6 ml
Solution de caféine	4 ml	4 ml

Mélanger par renversement et mesurer la densité optique à l'aide d'un électrophotomètre :

- la coloration est stable entre 3 et 15 minutes
- l'écran utilisé doit avoir un maximum de transmission compris entre 530 et 560 m μ .
- pour l'appareil de MEUNIER : cuve de 1 cm, diaphragmes à 10
- pour l'appareil ELECTROSYNTHESE (U.56 AT ou U.56 AV): tubes calibrés grand modèle, zéro du galvanomètre selon les indications du fabricant (10 ou 100 graduations du tambour).

Dans chaque cas, retrancher la densité optique du témoin de réactifs de celle obtenue avec le tube réaction, comme nous l'avons montré précédemment (chapitre II, C §2).

Le tableau ci-dessous résume les opérations à effectuer.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Témoins	Concentration en mg/litre	Densité optique ou graduations
Sol. B	x	$R_x - T_x = (B)$
1	10 + x	$R_1 - T_1 = (1)$
2	20 + x	$R_2 - T_2 = (2)$
3	30 + x	$R_3 - T_3 = (3)$
4	40 + x	$R_4 - T_4 = (4)$
5	50 + x	$R_5 - T_5 = (5)$
6	60 + x	$R_6 - T_6 = (6)$

CONSTRUCTION DE LA COURBE

Témoins	Densité optique ou graduations	Concentration en mg/litre
Sol. B	$(B) - (B)$	0
1	$(1) - (B)$	10
2	$(2) - (B)$	20
3	$(3) - (B)$	30
4	$(4) - (B)$	40
5	$(5) - (B)$	50
6	$(6) - (B)$	60

Avec les électrophotomètres que nous avons pu utiliser, la loi de BEER-LAMBERT fut rarement vérifiée au delà de 50 mg par litre

b) Pour la détermination d'une bilirubinémie

Deux cas sont à envisager selon que le sérum à étudier est :

- normal ou peu ictérique
- nettement ictérique (concentration dépassant les limites de la courbe d'étalonnage).

Dans le premier cas, utiliser le sérum pur et suivre le mode opératoire décrit pour les sérums titrés en bilirubine. Déduire la valeur du témoin de réactifs et se reporter à la courbe d'étalonnage qui donne directement la concentration du pigment, exprimée en mg par litre de sérum.

Dans le second cas, utiliser le sérum préalablement dilué de façon connue dans la solution de chlorure de sodium. Multiplier alors le résultat lu sur la courbe par le taux de la dilution utilisée. Il convient de ne pas pratiquer systématiquement une dilution importante si l'on veut conserver à la méthode une précision suffisante.

3°. RESULTATS

Nous pensons que la méthode proposée permet un dosage facile à réaliser avec une approximation voisine de 1 à 2 mg par litre. Utilisée dans quelques hôpitaux français depuis deux années environ, elle semble donner entière satisfaction pour les besoins de la clinique et constitue certainement un progrès par rapport à la méthode classique d'HIJMANS VAN DEN BERGH.

Nous avons pu faire, par rapport à cette dernière, un certain nombre de comparaisons, mais nous n'avons pu établir avec précision la relation qui existe entre les mg de bilirubine et les unités HVDB. La méthode colorimétrique de l'auteur hollandais est en effet assez peu précise comme nous l'avons déjà souligné.

On peut cependant admettre qu'une unité HIJMANS VAN DEN BERGH correspond à une quantité de bilirubine comprise entre 4 et 5 mg par litre.

Nous n'avons pas déterminé la bilirubinémie d'un grand nombre de sujets sains, mais nous avons choisi en milieu hospitalier 40 sérums en apparence normaux. Ces dosages nous ont permis de faire les constatations suivantes:

* la moyenne des résultats se situe entre 6 et 7 mg par litre.

* certains sérums donnent une réaction faible malgré leur aspect initial légèrement jaune; comme on obtient, dans ce cas, une coloration orangée, nous pensons que ce phénomène est dû à la présence de pigments caroténoïdes en quantité anormale, ou mieux encore de traces d'hémoglobine. Ceci n'introduit pas d'erreur dans le dosage puisque nous réalisons toujours un témoin de sérum et de réactifs.

* avec la plupart des auteurs, nous pensons que des taux inférieurs à 10 mg par litre ne doivent pas être considérés comme pathologiques.

E. Applications

1°. - MICROMETHODE

Bien que la technique proposée n'exige qu'une quantité réduite de sérum (moins de 1 ml), il est nécessaire d'avoir à sa disposition un procédé permettant un dosage sur une prise d'essai plus faible, en particulier en pédiatrie.

Nous avons étudié dans ce but les possibilités de notre méthode, et, pour l'exposé, nous distinguerons deux cas selon le degré d'intensité de l'ictère.

Sérums normaux ou peu ictériques

Nous conseillons, dans ce cas, d'utiliser le maximum de sérum et de mesurer cette quantité (que nous désignerons par x ml), dans un tube de faible contenance (8 à 10 ml) pour réduire les causes d'erreur au cours des manipulations suivantes.

Compléter à 0,8 ml avec la solution de chlorure de sodium.

Mélanger soigneusement.

Mesurer 0,4 ml de ce mélange dans un autre tube et continuer selon le processus habituel, en réservant les 0,4 ml qui restent pour la préparation du témoin de réactifs (la précision plus faible n'est pas gênante).

Le résultat lu sur la courbe donne la concentration en mg par litre dans la dilution. Il suffit de multiplier ce résultat par 0,8 pour obtenir le taux de bilirubine par l. de sérum. x

Sérums nettement ictériques

Nous avons vu que, dans ce cas, une dilution préalable du sérum est nécessaire.

Il suffira donc de préparer au moins 0,8 ml de dilution en fonction de la quantité de sérum disponible et de l'intensité de l'ictère, pour se retrouver dans le cas précédent. On se rappellera, cependant, que le dosage sera d'autant plus précis que la prise d'essai de sérum sera plus importante, et que la dilution préalable sera moins élevée.

Ceci est particulièrement intéressant dans les ictères hémolytiques du nouveau-né, comme le montre l'exemple théorique suivant :

160 mg de bilirubine par litre

0,1 ml de sérum utilisable.

Il serait alors nécessaire de réaliser une dilution au 1/8e. Comme nous avons vu que pour un électrophotomètre de type MEUNIER ou ELECTROSYNTHESE, une division correspond sensiblement à 1 mg par litre, la précision obtenue serait :

- pour la dilution : $20 \text{ mg} \pm 1$

- pour le sérum : $160 \text{ mg} \pm 8$.

Tenant compte du fait que des conditions aussi peu favorables sont vraiment exceptionnelles, nous n'avons pas jugé nécessaire la mise au point d'une véritable microméthode.

2°. APPLICATION EN COLORIMETRIE VISUELLE

Certains auteurs dont HASLEWOOD et KING (64), ont proposé comme témoin de référence une solution de rouge de méthyle en milieu acéto-acétique.

Pour mettre au point une méthode de dosage ne nécessitant pas d'électrophotomètre, nous nous sommes efforcés de déterminer la correspondance en bilirubine de la solution précédente. Pour cela nous avons essayé de titrer par notre méthode un grand nombre de sérums ictériques, et de les comparer ensuite avec le témoin de rouge de méthyle dans les conditions de la colorimétrie visuelle.

Nous n'avons pas poursuivi ce travail pour les raisons suivantes :

- * La colorimétrie visuelle manque de sensibilité, et le résultat peut varier d'un opérateur à un autre, comme nous avons pu le vérifier une fois encore.

- * La plupart des laboratoires possèdent actuellement un électrophotomètre de sensibilité suffisante, et l'étalonnage en bilirubine est facile à réaliser.

- * La coloration obtenue sur le sérum n'est pas exactement la même que celle du témoin artificiel, ce qui rend les comparaisons délicates, en particulier avec les sérums normaux ou peu ictériques et avec ceux renfermant de petites quantités d'hémoglobine (cas assez fréquent).

Nous pensons qu'il n'est pas souhaitable de voir utiliser comme référence cette solution de rouge de méthyle, et, pour cette raison, nous n'en donnerons pas la composition.

3°. DOSAGE DE LA BILIRUBINE DANS LA BILE

Cette question qui intéresse les pharmacologues, pose un certain nombre de problèmes qu'il est possible de résoudre, dans certains cas seulement, par la technique suivante :

-- Etalonnage : le même que pour le dosage de la bilirubine dans le sérum.

- Préparation et conservation de la bile : il est indispensable d'utiliser la bile dès son prélèvement, car la bilirubine biliaire s'oxyde très rapidement à l'air et à la lumière.

Diluer à $1/x$ la bile recueillie dans la solution de chlorure de sodium isotonique (x étant variable selon les animaux, mais, en général, égal à 5 ou 10, chez le rat en particulier).

Mélanger à parties égales la dilution précédente avec du sérum normal pour éviter l'altération des pigments et réaliser le complexe bilirubine-sérumalbumine. Ce mélange peut se conserver plusieurs jours au réfrigérateur, ce qui permet de pratiquer des dosages en série, en particulier pour l'expérimentation des médicaments cholérétiques.

- Dosage proprement dit : on le pratique sur 0,4 ml du mélange précédent dans les conditions habituelles. Le résultat obtenu correspond à la bilirubine biliaire contenue dans 0,2 ml de dilution de bile à $1/x$ et à la bilirubine contenue dans 0,2 ml de sérum normal. Il est donc nécessaire de faire un dosage sur 0,4 ml de ce sérum dilué au demi avec la solution de chlorure de sodium et de déduire le résultat du précédent. La différence multipliée par $2x$ donne le taux de bilirubine biliaire en mg par litre de bile.

Cette méthode de dosage n'est valable que dans le cas où la bile ne renferme pas de substances capables de donner un azoïque coloré avec l'acide sulfanilique diazoté (comme cela peut se produire au cours de l'expérimentation des cholérétiques). Dans ce cas particulier, il faudra donc, pour chaque nouveau corps, effectuer un certain nombre de vérifications :

- analyse spectrophotométrique de la coloration obtenue avec la bile témoin avant l'injection du produit à étudier.

- analyse identique sur la bile recueillie au cours de l'expérience, pour vérifier que la substance, ou ses métabolites, ne déplacent pas le maximum d'absorption.

En cas de doute (densité optique très augmentée et maximum d'absorption inchangé), on oxydara les pigments biliaires par le mélange acide phosphorique-acide nitreux (décrit et étudié dans la deuxième partie de ce travail) et on pratiquera ensuite la réaction à l'acide sulfanilique diazoté. Ce procédé peut éventuellement servir à la détermination de la bilirubine par différence.

Lorsque la méthode proposée est utilisable directement, elle se révèle à la fois précise et commode. S'il n'est pas possible de pratiquer le dosage par formation d'azoïque, on doit s'adresser à d'autres méthodes dont l'exposé sortirait du cadre de ce travail.

Deuxième partie

DOSAGE SÉPARÉ DES DIFFÉRENTES FRACTIONS

DE LA BILIRUBINE SÉRIQUE

CHAPITRE I

DOSAGE DE LA FRACTION "DIRECTE"

PAR LA REACTION DE VAN DEN BERGH

Ce procédé est d'autant plus largement employé qu'il est d'application facile, et qu'il ne fait pas intervenir d'autres réactifs que ceux déjà utilisés pour le dosage de la bilirubine totale. Il consiste à déterminer la densité optique de la coloration obtenue par addition de diazoréactif au sérum préalablement dilué.

On peut constater que la seule différence importante entre les diverses techniques basées sur ce principe réside dans le temps qui sépare l'addition du réactif et la lecture photométrique. Or, suivant les auteurs, ce temps varie de 1 à 120 minutes. Nous avons pensé qu'une discordance aussi importante méritait une étude un peu approfondie.

1°. TECHNIQUE UTILISEE AU COURS DE NOS ESSAIS

Nous avons utilisé une technique directement inspirée de celle que nous préconisons pour le dosage de la bilirubinémie totale :

- la solution de caféine est remplacée par celle de chlorure de sodium

-- pour les sérums très ictériques, la réaction est pratiquée sur la même dilution préalable du sérum pour la bilirubine "directe" et pour la bilirubine totale.

Les proportions utilisées sont donc les suivantes :

	TEMOIN	REACTION
Sérum pur ou dilué	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	—
Diazoréactif	—	0,6 ml
Solution de chlorure de sodium (9 p. 1000)	4 ml	4 ml

Dans toutes nos expériences, nous avons pris comme temps zéro le début de l'agitation du mélange qui suit immédiatement l'addition du diazoréactif.

Nous avons pratiqué des mesures après 1, 2, 3, 5, 10 et quelquefois 15 minutes, et nous avons construit la courbe représentative de la densité optique en fonction du temps.

Pour rendre les résultats plus démonstratifs, nous avons porté sur le graphique non pas les densités optiques mais leurs équivalents en mg de bilirubine par litre de sérum, obtenus d'après la courbe d'étalonnage de bilirubine totale.

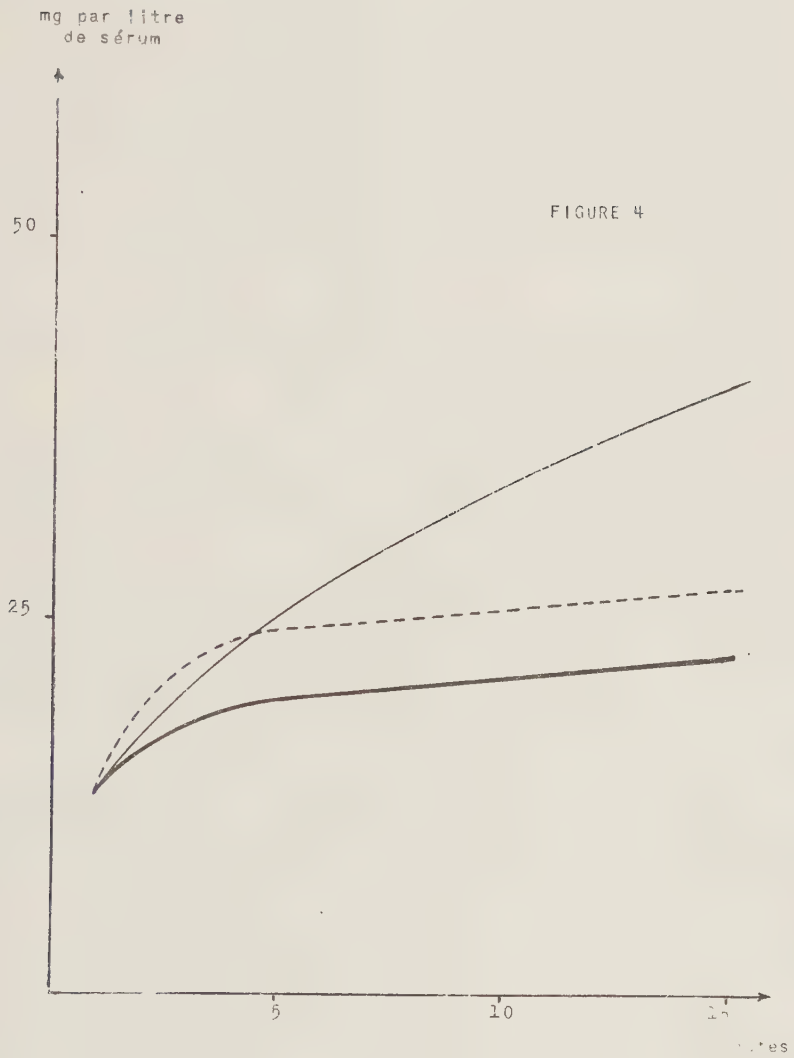
2°. CINETIQUE DE LA REACTION OBTENUE SUR DIVERS SERUMS

Appliquant la technique et le mode d'expression ci-dessus à divers échantillons de sérum ictérique, nous avons obtenu des courbes présentant l'allure générale de celles reproduites par MALLOY et EVELYN (79).

Ces courbes n'apportent pas de renseignements utiles pour les raisons suivantes :

* la plupart affectent la forme dite "intermédiaire" de MALLOY et EVELYN, c'est-à-dire celle d'un mélange de bilirubine conjuguée et non conjuguée.

* la reproductibilité des résultats est assez mauvaise, deux expériences effectuées sur le même sérum, ou la même dilution de sérum, fournissent rarement des chiffres concordants.



Cinétique de la réaction "directe" sur trois sérums
ictériques naturels

* le tracé des courbes ne présente aucun palier significatif qui permettrait de supposer qu'à ce stade la totalité de la bilirubine conjuguée a réagi avec le diazoréactif.

La figure 4 représente l'évolution de la réaction sur trois sérums différents, mais renfermant des taux assez voisins de bilirubine totale. Il est visible que le comportement de la bilirubine de ces sérums vis-à-vis du diazoréactif est notablement différent, bien que, dans ces trois cas, la densité optique soit la même au bout de 1 minute.

Pour cette raison, la lecture photométrique au bout de ce temps, conseillée par de nombreux auteurs, ne semble pas d'un grand intérêt pratique.

On peut remarquer également qu'après 5 minutes, la progression de la densité optique devient sensiblement linéaire, ce que nous avons pu constater sur la plupart des sérums étudiés. On peut donc se demander si, après la cinquième minute, l'augmentation de la densité optique n'est pas due à la bilirubine non conjuguée (ou "indirecte"). Nous montrerons plus loin (figure 5), que dans des sérums artificiels reconstitués avec de la bilirubine non conjuguée, cette fraction réagit avec un certain retard et progressivement sur le diazoréactif.

Il nous semble donc difficile, sinon impossible, de préciser au bout de quel délai doit être effectuée la lecture photométrique.

D'autre part, nous avons eu la surprise de constater que pour certains sérums, présentant une réaction directe très positive, la densité optique mesurée peut dépasser celle qui correspond à la bilirubine totale.

Par conséquent, on peut trouver, avec cette méthode, plus de pigments conjugués que de pigments totaux, comme le montrent les deux exemples suivants :

Sérum A : Bilirubine totale dans la dilution : 32 mg/l.

Bilirubine conjuguée dans la même dilution :

- après 3 minutes : 33 mg
- après 5 minutes : 34,5 mg
- après 10 minutes : 36 mg
- après 15 minutes : 36,5 mg

Sérum B : Bilirubine totale : 18 mg par litre

Bilirubine conjuguée :

- après 3 minutes : 16 mg
- après 5 minutes : 18,5 mg
- après 10 minutes : 20,5 mg
- après 15 minutes : 21 mg.

Comme les écarts relevés dépassent les erreurs d'expérience, nous devons conclure que les modalités réactionnelles dans les deux cas (bilirubine totale et bilirubine conjuguée) sont différentes.

Il n'est donc pas possible d'utiliser la même courbe d'étalonnage pour les deux déterminations, comme le font cependant tous les auteurs qui préconisent cette méthode de dosage de la bilirubine conjuguée. Il faudrait, pour réaliser un étalonnage correct, s'adresser à des témoins renfermant de la bilirubine biliaire, donc conjuguée, et mesurer la réaction directe pour construire la courbe.

Nous n'avons pas réalisé de tels essais, car d'autres facteurs interviennent dans la réaction. Nous allons montrer que ces facteurs sont importants et qu'ils rendent presque impossible l'application de la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH au dosage de la bilirubine conjuguée dans les sérums ictériques.

3°. INFLUENCE DE LA DILUTION PREALABLE PRATIQUEE SUR CERTAINS SERUMS

Nous avons montré, au début de ce chapitre, que cette méthode a pour base la réaction entre le diazoréactif et une dilution de sérum dans la solution de chlorure de sodium. Nous avons signalé, d'autre part, que dans le cas d'ictères importants, il faut utiliser non du sérum pur, mais du sérum préalablement dilué.

Le principe même de la méthode semble critiquable, puisque les travaux de WESTPHAL et GEDICK (111) et ceux de CORA (42) ont montré que la dilution des sérums ictériques augmente dans certains cas l'intensité de la réaction directe.

Après avoir vérifié ces données, nous avons étudié l'influence du taux de la dilution préalable des sérums très ictériques sur la densité optique obtenue.

Nous rapportons ci-dessous l'exemple de deux sérums C et D, pour lesquels la dilution préalable, choisie par l'opérateur, peut être de 1/6, 1/8 ou de 1/10. (les valeurs que nous rapportons correspondent au sérum pur).

	1/6	1/8	1/10
Sérum C : Bilirubine totale : 289 mg/l.			
Bilirubine conjuguée			
— lecture à 5 mn	235	276	285
— lecture à 15 mn	264	<u>296</u>	<u>305</u>

Sérum D : Bilirubine totale : 330 mg/l.			
Bilirubine conjuguée			
— lecture à 5 mn	258	268	320
— lecture à 15 mn	273	284	<u>350</u>

Ces exemples montrent l'importance de la dilution préalable sur la densité optique obtenue ; ils mettent en évidence les écarts possibles dans un même laboratoire, sur le même sérum, avec la même technique de dosage, selon que l'opérateur utilise un sérum dilué au 1/6° ou au 1/10°.

Nous noterons encore, dans les exemples ci-dessus, qu'après 15 minutes, la valeur obtenue pour la bilirubine "directe" peut dépasser le taux de bilirubine totale.

4°. INFLUENCE DE L'ORDRE DANS LEQUEL SONT MELANGES LES REACTIFS

Comme nous l'avons fait pour le dosage de la bilirubine totale, nous avons réalisé deux séries de mesures sur le même sérum, ou la même dilution de sérum :

- * expérience 1 : nous avons ajouté successivement au sérum : le diazoréactif, puis la solution de chlorure de sodium.
- * expérience 2 : nous avons inversé l'ordre des deux réactifs.

Nous avons construit la courbe représentant les variations de la densité optique en fonction du temps, et nous avons constaté que, sur un même sérum, les expériences 1 et 2 donnent des courbes sensiblement parallèles, mais non superposées.

Dans le tableau suivant, nous donnons quelques valeurs obtenues au même instant dans les deux expériences, sur des sérums très ictériques.

Sérums	A	B	C	D	E
Expérience 1	259	265	244	306	336
Expérience 2	240	249	240	258	306

On peut constater que dans certains cas la différence est peu sensible (sérum C par exemple), mais elle peut aussi être très importante (sérum D).

5°. COMPORTEMENT DE LA BILIRUBINE NON CONJUGUEE DANS LA REACTION DIRECTE

Pour essayer de préciser le rôle de cette fraction, nous avons appliqué la méthode à des sérums reconstitués ne contenant que de la bilirubine non conjuguée, et en particulier sur les témoins que nous préconisons pour l'étalonnage d'un électrophotomètre.

Nos essais ont porté sur trois sérums A, B et C renfermant respectivement 30, 50 et 100 mg de pigment par litre. Nous les avons utilisés sans dilution préalable, et nous avons obtenu les résultats suivants :

* sérum A :

pas de coloration avant 3 minutes

augmentation sensiblement linéaire de la densité optique jusqu'à 20 minutes où la coloration correspond à 3,5 mg par litre soit un peu plus de 10 p. 100 de la bilirubine totale.

* sérum B :

la coloration est sensible dès la première minute

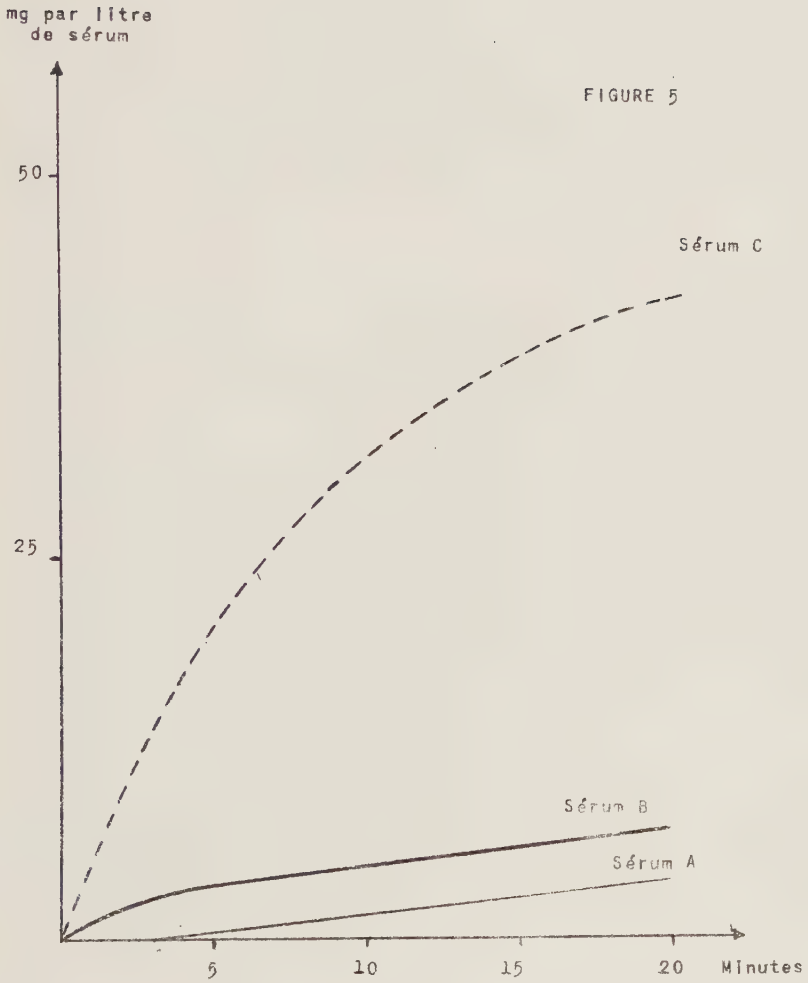
la densité optique augmente de façon à peu près linéaire entre 5 et 20 minutes; à cet instant la coloration représente 7 mg par litre, soit environ 15 p.100 du pigment total.

* sérum C :

l'apparition de la coloration est pratiquement immédiate, elle augmente sans progression linéaire jusqu'à 20 minutes, où la densité optique correspond à 42 mg par litre, soit 42 p.100 de la bilirubine totale.

Comme on peut reprocher à nos sérums reconstitués de ne renfermer que 80 p. 100 de sérum pur, nous avons repris l'expérimentation sur des témoins ne contenant que 5 p. 100 de solution aqueuse et sur des sérums naturels présentant une réaction qualitative de VAN DEN BERGH négative. Nous avons constaté que, dans tous les cas, la coloration rose apparaît plus ou moins vite et plus ou moins intensément.

L'intervention de la bilirubine non conjuguée dans la réaction semble évidente, et on comprend pourquoi certains auteurs font effectuer la lecture au bout d'un temps court, inférieur à 5 minutes. C'est pour cette raison que SCHALM et SCHULTE (96), après avoir effectué une mesure à la dixième minute, appliquent un coefficient de correction tendant à diminuer le résultat du dosage.



Cinétique de la réaction "directe" sur trois sérums reconstitués de type "indirect".

6°. CONCLUSIONS

Le principe même de la méthode semble contestable puisque la réaction est toujours pratiquée sur une dilution importante de sérum ictérique.

Le comportement des diverses formes de bilirubine vis-à-vis du diazoréactif n'est pas aussi bien défini qu'on pouvait le croire à la suite des travaux d'HIJMANS VAN DEN BERGH. Il est pratiquement impossible de préciser à quel moment toute la bilirubine conjuguée a réagi avec l'acide sulfanilique diazoté, et à quel moment le pigment non conjugué commence à se transformer en azoïque.

De nombreux autres facteurs interviennent en outre dans cette réaction, et les conclusions de cette étude critique, confirmant celles d'un travail antérieur (46) seront donc très réservées.

La réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH conserve tout son intérêt à condition de ne lui demander que des renseignements d'ordre qualitatif. Certains auteurs ayant voulu l'utiliser pour un dosage, il serait souhaitable de voir les résultats quantitatifs accompagnés de précisions du type de celle utilisée quelquefois à l'étranger : "the one-minute bilirubin". En l'absence de certitude sur la nature de la substance dosée, cette mention apporterait au moins une probabilité dans la concordance des résultats obtenus, bien que les courbes rapportées dans la figure 4 limitent son importance pratique.

CHAPITRE II

EXTRACTION DE LA BILIRUBINE

NON CONJUGUEE PAR

LES SOLVANTS ORGANIQUES

1. CHLOROFORME

Nous n'avons pas réalisé d'expériences détaillées avec ce procédé, car VARELA-FUENTES et ses collaborateurs ont effectué sur ce principe de très nombreux travaux (99 à 109), entre 1931 et 1934.

Ces auteurs semblent avoir étudié tous les aspects du problème, et nous nous contenterons de rapporter la conclusion qui accompagne leur technique définitive publiée en 1934 (100). Selon VARELA-FUENTES et RECARTE, le rendement de l'extraction se rapproche de 80 p. 100 (pour la bilirubine non conjuguée) comme nous l'avons déjà rapporté au cours de notre exposé bibliographique.

Nous signalerons cependant, et nous l'avons vérifié expérimentalement, que le résidu obtenu après évaporation du chloroforme donne une réaction positive en présence d'alcool éthylique et d'acide sulfanilique diazoté, ce qui n'est pas le cas du résidu d'extraction benzénique, étudié au paragraphe suivant.

2. BENZENE

Disons tout d'abord que le benzène, bien connu pour sa toxicité chronique, nous paraît dangereux, non seulement pour l'opérateur lui-même, mais aussi pour les autres personnes travaillant dans le même local. Si ce solvant devait

être utilisé pour un assez grand nombre de sérums chaque jour, il serait nécessaire de prévoir une pièce spécialement équipée (en particulier munie d'un système de ventilation).

Nous ne donnerons ici que les conclusions de notre expérimentation :

* La solution benzénique est nettement plus colorée que la solution chloroformique correspondant au même sérum, comme l'avaient déjà constaté BENARD, GADJOS et TISSIER (16), fait rapporté dans leur ouvrage sur l'Hémoglobine et les pigments apparentés.

* Il faut effectuer l'extraction dans des conditions bien définies, identiques d'une opération à l'autre, en particulier pour l'agitation (durée et protocole de cette agitation).

* Ces conditions étant déterminées, il importe de construire une courbe de rendement de l'extraction en s'adressant, non à des solutions témoins aqueuses, mais à des sérums reconstitués du type de ceux que nous avons proposés. En effet, comme l'ont d'ailleurs constaté BESSON et FAUVERT (19), l'opération sur le sérum n'est pas quantitative. Dans la deuxième technique publiée par ces auteurs, il est conseillé de pratiquer, dans certains cas, deux extractions successives.

* Le pigment jaune extrait par le benzène n'est pas de la bilirubine puisqu'il ne donne pas de coloration avec le réactif d'HIJMANS VAN DEN BERGH. Nous avons pu le constater au cours des expériences suivantes :

- évaporation du benzène, soit sous vide, soit à une température inférieure à 40° C, et reprise du résidu par l'alcool et le diazoréactif.

- addition d'alcool et de diazoréactif à la solution benzénique **sans évaporation.**

- agitation de la solution benzénique avec un mélange de diazoréactif et de solution de caféine.

Dans ce dernier cas, la solution aqueuse est très légèrement colorée en rose, mais cette coloration ne représente qu'une faible partie de la bilirubine non conjuguée ajoutée dans le sérum avant l'expérience.

Il semble donc possible de conclure à l'altération de la bilirubine au cours de son extraction par agitation prolongée (deux minutes). Ceci nous paraît un inconvénient pour deux raisons :

- les produits de dégradation de la bilirubine sont nombreux, variés et imparfaitement connus.
- il n'est pas impossible que dans certains cas le benzène puisse entraîner d'autres pigments jaunes, cause d'erreur alors inévitable, puisque le dosage se termine par la colorimétrie directe de la solution benzénique.

Par conséquent, sans vouloir condamner la méthode au benzène, nous pensons qu'il est préférable de l'éviter et qu'il est surtout indispensable d'utiliser pour exprimer le résultat le terme prudent de "bilirubine benzéno-extractible", proposé par BENHAMOU et BESSON, puis par BESSON et FAUVERT (19).

On peut donc faire à cette méthode deux reproches essentiels : l'emploi du benzène, et le principe même de l'extraction qui, comme pour le chloroforme n'est jamais quantitative et qui, de plus, altère la molécule de bilirubine au cours des opérations.

CHAPITRE III

ACTION DES OXYDANTS SUR LES
DIVERSES FORMES DE BILIRUBINE SERIQUE

L'étude des méthodes par "cinétique" ou par extraction ne nous ayant pas donné satisfaction, nous nous sommes adressés à un autre caractère différentiel de la bilirubine et de ses formes conjuguées : la sensibilité vis-à-vis des agents oxydants et de la lumière.

Nous rappelons que selon le tableau emprunté à WITH (112) :

* la bilirubine non conjuguée, à réaction indirecte, est stable en présence des oxydants, mais elle est sensible à la lumière.

* la bilirubine conjuguée, à réaction directe, est par contre instable en présence des oxydants, mais peu sensible à la lumière.

Ces propriétés paraissent intéressantes puisqu' en traitant un sérum par un agent oxydant à l'obscurité, il serait possible de détruire les pigments conjugués sans altérer la bilirubine à réaction indirecte.

Nous avons expérimenté successivement l'eau oxygénée dont le pouvoir oxydant est facile à déterminer avec précision, puis l'acide nitreux (sous la forme de mélange de nitrite de sodium et d'acide phosphorique) proposé par CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (29).

A. Action de l'eau oxygénée sur les sérums ictériques

Ce procédé ne nous a pas permis de mettre au point une méthode valable, aussi rapporterons-nous de façon schématique les conclusions de nos expériences, c'est-à-dire les raisons pour lesquelles l'eau oxygénée ne semble pas utilisable dans ce cas particulier.

Pour juger de l'activité de cet agent oxydant sur la bilirubine du sérum, nous avons mis en évidence le pigment restant après oxydation, par sa propriété de réagir avec l'acide sulfanilique diazoté pour former un azoïque coloré.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- * Le contact sérum-eau oxygénée donne lieu à la formation d'une mousse importante, ce qui rend délicate la mesure d'un volume exact de ce mélange.
- * Après oxydation par l'eau oxygénée à 10 volumes, l'addition de diazoréactif montre presque toujours l'existence d'une réaction "directe".
- * Après oxydation par l'eau oxygénée à 100 volumes, les résultats dépendent de l'ordre dans lequel sont introduits les réactifs. Si l'acide sulfanilique diazoté est ajouté après la solution de caféine, on voit apparaître une coloration rose, mais si, au contraire, la solution de caféine est ajoutée à la fin, cette coloration n'apparaît pas.

Devant ces derniers résultats, nous avons pensé à une destruction du diazoréactif par l'eau oxygénée, ce qui semble confirmé par l'expérience suivante :

- mesurer dans un tube à essais :

Diazoréactif	0,6 ml
Eau oxygénée à 100 volumes	0,1 ml

- laisser quelques minutes en contact, puis ajouter :

Solution de caféine	4 ml
Sérum ictérique	0,4 ml

On ne voit apparaître aucune coloration dans le tube.

Nous avons ensuite essayé, après l'action de l'eau oxygénée sur le sérum, de détruire l'oxydant en excès, en particulier par le sulfite de sodium et par l'acide ascorbique. Nous ne détaillerons pas ces essais qui furent très décevants, et nous rapporterons les expériences réalisées avec l'acide nitreux.

B. Action de l'acide nitreux sur les sérums ictériques

Comme l'acide nitreux participe déjà à la réaction utilisée pour le dosage de la bilirubine totale, il était permis d'espérer qu'il n'apporterait pas d'interférences gênantes.

Cet acide nitreux est d'ailleurs à la base d'une méthode de dosage, celle de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT (29) qui se propose de déterminer l'oxydabilité totale et relative de la bilirubine du sérum.

Nous en rappelons ci-dessous les données essentielles :

* Oxydabilité totale

- pour les sérums normaux ou peu ictériques :

	REACTION	TEMOIN
Sérum pur	0,5 ml	0,5 ml
Acide phosphorique concentré	0,45 ml	0,45 ml
Nitrite de sodium à 0,5 p.1000	0,05 ml	-
Eau distillée	-	0,05 ml

- pour les fortes cholémies, on opère sur du sérum dilué au 1/20 dans l'acide phosphorique pur.

Dans les deux cas, la lecture photométrique est faite à 650 m μ , en suivant l'évolution de la coloration, et en notant la valeur maxima obtenue (au bout de 3 à 5 minutes en général).

* Oxydabilité relative

On prépare extemporanément le mélange suivant :

Acide phosphorique à 2 p. 100	10 ml
Nitrite de sodium à 0,5 p.100	0,3 ml

Le sérum ictérique est plus ou moins dilué (1/2 à 1/10) avec ce réactif, puis la lecture est pratiquée dans les mêmes conditions que précédemment.

Il semble qu'une erreur se soit glissée dans l'impression de cette formule : il est logique, et nous le montrerons plus loin, de penser que, dans les deux cas, les auteurs ont utilisé la même solution de nitrite de sodium à 0,5 p. 1000.

1°. ESSAIS PRELIMINAIRES

Nous n'indiquerons ici que les résultats de ces essais, c'est-à-dire les conditions bien déterminées choisies pour la phase d'oxydation, et pour le dosage de la bilirubine persistant dans le sérum après l'action de l'acide nitreux.

* Le réactif phosphonitreux (acide phosphorique et nitrite de sodium) est toujours préparé extemporanément, il n'est pas utilisé pendant plus de 30 minutes.

* Les différentes solutions de nitrite de sodium sont préparées au moment de l'emploi à partir d'une solution à 0,5 p. 100 datant d'une semaine au maximum (nous avons vérifié qu'elle ne s'altère pas dans ces conditions), ce qui correspond d'ailleurs aux règles établies pour la préparation du diazoréactif.

* L'oxydation elle-même est toujours réalisée en mélangeant des volumes égaux de sérum et de réactif phosphonitreux. Le mélange est immédiatement placé à l'obscurité pendant le temps de contact.

* Pour le dosage de la bilirubine non oxydée, nous n'avons pas mesuré la densité optique de la coloration verte obtenue, car ce procédé est assez peu commode pour les dosages en série. De plus, les conditions d'obscurité, nécessaires pour ne pas altérer la bilirubine non conjuguée, ne sont pas remplies puisque le mélange est traversé par le faisceau lumineux pendant toute la durée de la mesure.

* Nous avons préféré nous adresser à une méthode dérivée de celle que nous utilisons pour le dosage de la bilirubine totale. Les conditions opératoires étant identiques dans les deux cas, il devient possible d'utiliser la même courbe d'étalonnage, et de calculer la bilirubine oxydée par différence entre les deux dosages.

* Nous avons donc étudié les conditions du dosage de la bilirubine non oxydée par comparaison avec celui de la bilirubine totale.

Pour cela, nous avons tout d'abord employé le réactif phosphonitreux préconisé par CHABROL et ses collaborateurs, c'est-à-dire celui qui se prépare avec la solution de nitrite de sodium à 0,5 p. 100. Avec une telle formule, nous avons vu apparaître très rapidement dans le mélange de sérum et de réactif une coloration verte intense, même en utilisant des sérums ne présentant pas de réaction "directe" positive, ou ayant été reconstitués avec de la bilirubine libre (indirecte).

D'autre part, en essayant de doser la fraction non oxydée, nous avons constaté que l'addition d'acide sulfanilique diazoté ne produisait pas de coloration rose. Il fallait donc admettre que l'oxydation allait trop loin, et revenir, comme nous le suggérions plus haut, à la solution de nitrite de sodium à 0,5 p. 1000. seulement.

Avec le réactif phosphonitreux ainsi préparé, nous avons pu faire les premières constatations suivantes :

- le mélange de sérum et de réactif, placé à l'obscurité, prend rapidement une teinte verte si le sérum de départ présente une réaction directe positive.
- après quelques minutes de contact, en appliquant à 0,4 ml de mélange la technique proposée pour le dosage de la bilirubine totale, nous avons mis en évidence une certaine quantité de pigment donnant encore lieu, dans ces conditions (en présence de solution de caféine et de diazoréactif), à la formation d'un azoïque coloré.

Ces essais préalables nous ont conduit à une étude plus précise des réactions d'oxydation et de diazotation que nous exposerons dans l'ordre suivant :

1. Méthodes utilisées pour mettre en évidence l'action oxydante

- séparation chromatographique
- sérums ictériques naturels ou artificiels

2. Influence du réactif phosphonitreux sur la réaction colorée
3. Influence du temps de contact et de la concentration en acide nitreux
4. Influence de la dilution préalable des sérums très ictériques
5. Cas des sérums naturels renfermant très peu de bilirubine non oxydable
6. Coloration obtenue et importance du témoin
7. Reproductibilité des résultats
8. Comparaison avec la réaction qualitative d'HIJMANS VAN DEN BERGH.

2°. ETUDES SYSTEMATIQUES SUR L'OXYDATION ET LA REACTION COLOREE

1. Méthodes utilisées pour mettre en évidence l'action oxydante

Pour étudier l'action de l'acide nitreux sur les différentes fractions de pigment, nous pouvons utiliser soit une séparation chromatographique avant et après oxydation, soit des sérums reconstitués ne présentant que l'une ou l'autre des formes de bilirubine (conjuguée ou non).

Pour caractériser la bilirubine, sous toutes ses formes, nous considérons comme essentielle la possibilité de donner un azoïque coloré avec l'acide sulfanilique diazoté, propriété qui disparaît après l'action des agents oxydants.

SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Pour notre étude, une séparation précise et sensible des formes conjuguées ou non est indispensable, et, pour cette raison, nous avons pensé que la méthode chromatographique était susceptible de répondre à ces exigences.

BILLING (20) a décrit un mode de séparation sur colonne des pigments biliaires du sérum, mais sans valeur pour nos expériences puisque les caractéristiques en sont les suivantes :

- Concentration minimum en bilirubine totale : 40 mg par litre de sérum
- Extraction alcoolique qui, selon l'auteur, ne permet pas d'obtenir plus de 85 à 90 p. 100 des pigments totaux.

Il est bien évident que de telles imperfections sont incompatibles avec la précision qui nous est nécessaire.

Un certain nombre d'auteurs ont essayé une séparation sur papier des pigments extraits du sérum, mais les résultats publiés ne sont pas démonstratifs (39, 81, 85, 86,87):

* L'extraction par l'alcool est incomplète comme dans le cas précédent.

* Les pigments sont mal séparés (nous constatons en particulier sur les figures et les tableaux que les spots sont mal définis et que tous les Rf sont inférieurs à 0,20).

Nous avons repris ces dernières expériences, en utilisant différents solvants pour l'extraction et pour la chromatographie elle-même, ce qui nous a permis de constater que cette méthode sur papier n'est pas plus précise que celle de BILLING.

Nous pensons que toutes les difficultés rencontrées sont dues au complexe bilirubine-sérumalbumine (forme circulante du pigment) puisque nous avons remarqué :

- l'impossibilité d'une extraction complète de la bilirubine par ses solvants habituels.
- la mauvaise séparation chromatographique qui provient sans doute des protéines extraites en même temps que les pigments.

Il semble donc qu'une séparation chromatographique, théoriquement très séduisante, soit inutilisable dans ce cas particulier. Pour cette raison, nous avons travaillé sur des sérums ictériques reconstitués, puis sur des sérums naturels pour confirmer nos résultats.

SÉRUMS UTILISÉS DANS NOTRE EXPERIMENTATION

a) Sérums reconstitués avec de la bilirubine non conjuguée

Les sérums que nous préconisons pour l'étalonnage d'un photomètre en vue du dosage de la bilirubinémie totale renferment bien de la bilirubine non conjuguée, mais ils ne contiennent que 80 p. 100 de sérum pur. Ces témoins donnent, comme nous l'avons signalé une légère réaction directe, due sans doute à ce qu'ils renferment une proportion importante de solution aqueuse. Cette propriété, sans importance lors d'un dosage de pigment total, devient très gênante pour l'expérimentation des mélanges oxydants.

Nous avons donc préparé d'autres témoins contenant une quantité de sérum voisine de 95 p.100, à l'aide d'une solution aqueuse de bilirubinate de sodium titrant environ 1,50 g par litre. Nous avons utilisé les mêmes proportions de soude 0,1 N que précédemment, pour rester dans les conditions de pH déjà discutées dans un chapitre précédent. De tels témoins ne donnent plus qu'une très faible réaction directe avec l'acide sulfanilique diazoté.

b) Sérums reconstitués avec de la bilirubine biliaire

Pour préparer des témoins de bilirubine à réaction directe, nous avons eu recours à des mélanges de bile et de sérum humain, en prenant la précaution de recueillir la bile de chien sans contact avec l'air et de l'utiliser sans tarder.

La bile vésiculaire étant très riche en pigments conjugués, il est ainsi possible de reconstituer des témoins très concentrés. Cependant, l'expérience montre que l'addition de réactif phosphonitreux amène une floculation importante rendant toute mesure colorimétrique impossible si la concentration dépasse 80 mg par litre (on peut penser que cette floculation provient de l'insolubilisation des acides biliaires par acidification).

c) Sérums reconstitués mixtes

Nous les avons réalisés par addition à du sérum humain, de solution aqueuse de bilirubinate de sodium et de bile vésiculaire.

d) Sérums ictériques naturels

Pour compléter notre expérimentation et vérifier nos résultats, nous avons utilisé des sérums naturels, en particulier des sérums très riches en pigment, qui présentaient une réaction directe très positive.

2. Influence du réactif phosphonitreux sur la réaction colorée

Sur un sérum reconstitué titrant environ 80 mg de bilirubine non conjuguée par litre, nous avons réalisé les expériences suivantes :

* dosage de la bilirubine totale

Nous avons opéré sur 0,4 ml d'une dilution au demi dans la solution de chlorure de sodium, car après oxydation, le dosage se pratique sur 0,4 ml d'une même dilution dans le réactif phosphonitreux.

* addition du réactif phosphonitreux dans le milieu réactionnel

Les résultats suivants concernent le réactif phosphonitreux préparé avec la solution de nitrate de sodium à 0,5 p. 1000, qui sera choisie ultérieurement.

Premier essai

Sérum	0,2 ml
Solution de caféine	4 ml

A ce mélange, nous avons ajouté :

Réactif phosphonitreux	0,2 ml
Diazoréactif	0,6 ml

Dans ces conditions, nous avons constaté que le réactif phosphonitreux, ajouté, soit avant, soit après le diazoréactif, ne perturbe en aucun cas la formation d'azoïque, c'est-à-dire la densité optique de la réaction colorée mesurée à l'électrophotomètre.

Deuxième essai

Sérum 0,2 ml

Réactif phosphonitreux 0,2 ml

Nous avons mélangé et ajouté immédiatement et dans cet ordre :

Solution de caféine 4 ml

Diazoréactif 0,6 ml

Dans ce cas, et comme précédemment, la densité optique reste égale à celle obtenue lors du dosage de la bilirubine totale.

Troisième essai

Sérum 0,2 ml

Réactif phosphonitreux 0,2 ml

Diazoréactif 0,6 ml

Après avoir mélangé, nous avons ajouté sans attendre :

Solution de caféine 4 ml

Cette dernière expérience montre une oxydation rapide d'une partie du pigment non conjugué. D'après les résultats des deux premiers essais, nous devons admettre que ce résultat est dû à l'action simultanée du réactif phosphonitreux et du diazoréactif.

Nous pensons que ces constatations s'expliquent ainsi :

* Le diazoréactif renferme une grande quantité de nitrite de sodium, mais son acidité est faible, insuffisante

pour que, mélangé au sérum fortement tamponné, le pH obtenu soit assez bas pour que l'acide nitreux exerce son action oxydante.

* Le réactif phosphonitreux renferme beaucoup moins de nitrite de sodium (30 fois moins); ajouté seul, il n'a pas un pouvoir oxydant suffisant pour altérer rapidement la bilirubine non conjuguée, malgré son acidité importante.

* Le mélange de ces deux réactifs réalise des conditions d'acidité et de concentration en nitrite de sodium suffisantes pour oxyder presque instantanément une fraction non négligeable de la bilirubine non conjuguée contenue dans le sérum.

Dans les deux premiers essais, la solution de caféine ajoutée avant le diazoréactif tamponne le milieu par la quantité importante d'acétate de sodium qu'elle introduit dans le mélange. Ceci explique pourquoi, dans ces conditions, la présence de réactif phosphonitreux ne perturbe pas le dosage de la bilirubine totale.

Ces essais nous paraissent fondamentaux, car, après action du réactif oxydant sur un sérum, le dosage de la bilirubine non oxydée ne sera possible qu'en ajoutant, au mélange obtenu, la solution de caféine avant le diazoréactif.

3. Influence de la concentration en acide nitreux et du temps de contact

Comme le réactif phosphonitreux n'influe pas sur le dosage de la bilirubine totale, dans les conditions que nous venons de préciser, nous pouvons étudier les deux facteurs essentiels de la réaction d'oxydation:

- la concentration en acide nitreux du réactif oxydant
- le temps de contact entre ce dernier réactif et le sérum ictérique.

Pour l'étude de ces deux facteurs, nous avons analysé, entre 1 et 30 minutes, l'action des réactifs phosphonitreux, préparés avec des solutions de nitrite de sodium de concentration variable (entre 0,1 et 1 p.1000), sur les sérums ictériques naturels et reconstitués décrits au paragraphe précédent.

Pour chacun des différents réactifs, nous avons opéré de la manière suivante :

* Dosage de la bilirubine totale sur le sérum dilué au demi dans la solution de chlorure de sodium.

* Dosage de la bilirubine non oxydée :

- oxydation en mélangeant des volumes égaux de sérum et de réactif phosphonitreux, et en plaçant le tube à l'obscurité.

- prélèvement de deux fois 0,4 ml de mélange, à intervalles de temps réguliers, ajoutés dans deux tubes contenant déjà 4 ml de solution de caféine (0,4 ml pour le témoin de réactifs et 0,4 ml pour la réaction colorée).

- agitation immédiate pour arrêter l'action oxydante de l'acide nitreux, puis addition du diazoréactif et lecture photométrique, dans les conditions habituelles.

Nous ne donnerons pas ci-dessous des tableaux de valeurs expérimentales, mais seulement des conclusions générales. Dans l'exposé de nos résultats, nous avons désigné par x (en g par litre), la concentration de la solution de nitrite utilisée pour la préparation du réactif phosphonitreux.

a) Témoins de bilirubine non conjuguée

Pour x inférieur ou égal à 0,6, le pigment n'est pas altéré pour un temps de contact égal à 20 minutes.

Pour x égal à 0,7, la bilirubine non oxydée diminue lentement mais régulièrement à partir de la huitième minute environ.

Pour x égal à 1, le même phénomène commence à la cinquième minute.

Nous pouvons donc dire que la bilirubine non conjuguée est stable dans ces conditions, si le temps de contact ne dépasse pas 20 minutes et si la concentration de la solution de nitrite est inférieure ou égale à 0,6 p. 1000. Nous ferons également remarquer que le sérum utilisé pour ces expériences renfermait environ 100 mg de bilirubine par litre, c'est-à-dire une concentration importante.

Nous soulignerons enfin que ces témoins ne sont pas aussi stables que des sérums naturels (très légère réaction directe), et ceci nous paraît constituer un argument supplémentaire pour affirmer la stabiliser de la bilirubine non conjuguée dans les conditions où nous opérons.

b) Témoins de bilirubine conjuguée

Sur des témoins renfermant 60 à 80 mg par litre de bilirubine totale, nous avons obtenu les résultats moyens suivants :

- pour $x = 0,4$: oxydation totale en 15 minutes environ
- pour $x = 0,5$: il faut seulement 10 à 11 minutes
- pour $x = 0,6$: il faut moins de 10 minutes.

Dans ces expériences, nous considérons que la réaction est terminée, lorsque la fraction non oxydée reste stable à une valeur correspondant à la concentration de la bilirubine non conjuguée apportée par le sérum humain qui sert de base à la préparation.

Ces résultats montrent que pour oxyder toute la bilirubine non conjuguée du sérum, il faut :

- une concentration en nitrite de sodium comprise entre 0,4 et 0,6 p.1000 pour la préparation du réactif phosphonitreux.
- un temps de contact égal à 15 minutes pour la concentration en nitrite de sodium la plus faible .

Nous avons donc adopté la formule de CHABROL, BOSZORMENYI et FALLOT, qui renferme du nitrite à 0,5p.1000 et qui offre l'avantage de présenter une marge de sécurité de 20 p. 100 par rapport aux valeurs extrêmes énoncées ci-dessus.

Nous donnons cependant les quelques précisions supplémentaires suivantes, concernant la préparation et l'utilisation de ce réactif phosphonitreux :

- utiliser une solution mère de nitrite de sodium à 0,5 p. 100 datant de moins de huit jours.
- diluer cette solution au moment de l'emploi pour obtenir 0,5 p.1000 (au 1/10e).
- préparer le réactif avec les proportions suivantes :

Solution de nitrite de sodium à 0,5 p.1000	0,3 ml
Acide phosphorique à 2 p. 100	10 ml
- mélanger soigneusement et rejeter le réactif 30 minutes après sa préparation.

A titre d'exemple, nous rapportons ci-dessous les résultats obtenus sur un témoin de bilirubine conjuguée.

Bilirubine totale : 66 mg par litre

Bilirubine apportée par le sérum normal : 6 mg
par litre (déterminée grâce à un témoin dans lequel la bile a été remplacée par de l'eau distillée).

Durée de l'oxydation (en minutes)	2	4	6	8	10	12	14	16
Bilirubine non oxydée (en mg par litre)	30	18	13	9	7	6	5	6

Dans la figure 6, nous avons construit la courbe représentative de la bilirubine non oxydée en fonction du temps.

c) Témoins mixtes

Avec ces témoins, qui contiennent à la fois de la bile et de la bilirubine non conjuguée, nous avons pu vérifier que :

- les pigments conjugués sont oxydés en totalité
- la bilirubine non conjuguée n'est pas altérée.

Nous donnerons un exemple pour illustrer ces résultats dont la courbe représentative est rapportée dans la figure 6.

Bilirubine totale : 107 mg par litre

Bilirubine non conjuguée : 27 mg par litre (déterminée comme au paragraphe précédent.)

Durée de l'oxydation (en minutes)	2	3	5	7	9	11	13	15	17
Bilirubine non oxydée (en mg par litre)	60	46	41	38	32	27	28	28	27

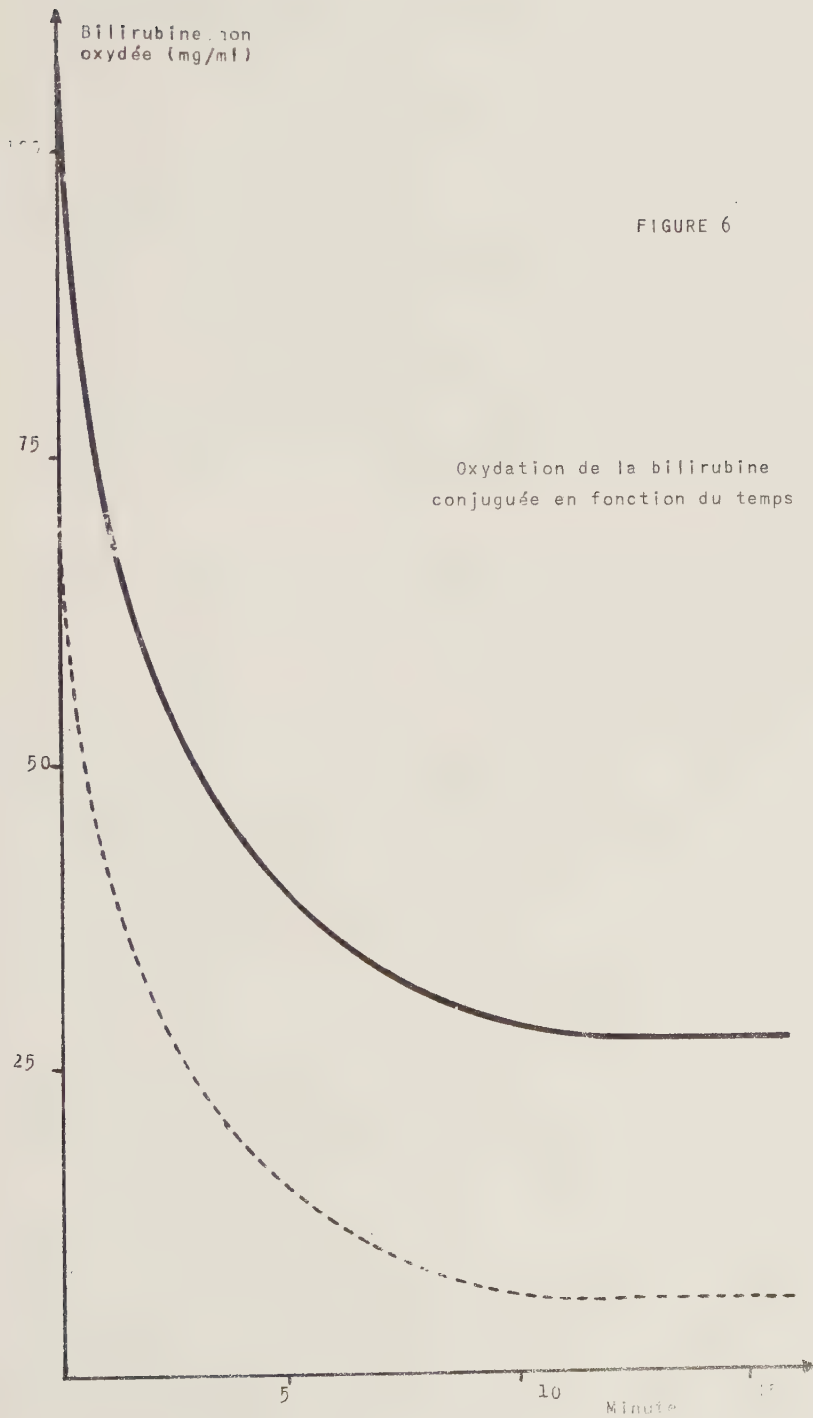
Si l'on tient compte de la précision de la méthode utilisée pour le dosage de la bilirubine totale du sérum, les deux exemples numériques précédents montrent que, dans les conditions où nous sommes placés :

- toute la bilirubine conjuguée apportée par la bile est détruite en moins de quinze minutes, si la concentration ne dépasse pas 80 mg par litre.
- la concentration en bilirubine non oxydable correspond exactement à celle de la bilirubine non conjuguée, déterminée expérimentalement avant l'addition de bile.

d) Sérums ictériques naturels

Nous nous sommes adressés à ces sérums pour deux raisons :

- confirmer les résultats expérimentaux obtenus avec les témoins reconstitués
- étudier la valeur oxydante du réactif phosphonitreux sur des concentrations en bilirubine conjuguée supérieures à 80 mg par litre (nous avons expliqué page 118 pour quelles raisons on ne peut pas obtenir avec de la bile des témoins plus concentrés).



Sur des sérums naturels, renfermant moins de 100 mg de bilirubine totale par litre, nous avons pu vérifier que la courbe représentative de la bilirubine non oxydée, en fonction du temps de contact, est analogue à celle fournie par les sérums artificiels.

Nous avons ensuite utilisé des sérums très riches en pigment, et présentant une réaction directe très positive, pour étudier le pouvoir oxydant maximum de notre réactif dans les conditions opératoires.

L'exemple ci-dessous concerne un sérum de ce type titrant 205 mg de bilirubine totale par litre. Nous avons pratiqué la réaction d'oxydation avec deux réactifs phosphonitieux, qui diffèrent par le titre de la solution de nitrite de sodium employée pour leur préparation.

Temps de contact (en minutes)	10	15	20
Bilirubine non oxydée (mg/litre)			
- pour x = 0,5	45	42	40
- pour x = 0,6	34	30	29

Cet exemple montre que le réactif phosphonitieux, tel que nous l'avons défini plus haut, ne convient pas pour les sérums très ictériques, utilisés selon la technique classique. Il est donc indispensable de les diluer avant de les soumettre à l'action de l'acide nitreux.

Nous avons donc étudié l'influence de cette dilution sur le comportement de la réaction d'oxydation pratiquée ultérieurement.

4. Influence de la dilution préalable des sérums très ictériques

Cette dilution étant indispensable, nous avons tout d'abord pensé à la solution isotonique de chlorure de sodium pour la réaliser, comme nous l'avons fait pour le dosage de la bilirubinémie totale.

Comme le point important est la conservation de la bilirubine non conjuguée, nous avons tout d'abord dilué au demi un témoin reconstitué de type "indirect" avec la solution de chlorure de sodium à 9 g par litre.

Les résultats obtenus avec le réactif phosphonitreux habituel ont été les suivants :

Bilirubine totale : 46 mg par litre

Temps de contact (en minutes)	5	10	15	20
Bilirubine non oxydée (en mg par litre)	40	35	32	30

La dilution préalable d'un sérum très ictérique, en vue de la réaction avec le réactif phosphonitreux, ne doit donc jamais être réalisée avec une solution aqueuse puisque, comme nous venons de le constater, une partie de la bilirubine non conjuguée risque d'être détruite.

Nous avons pensé qu'il se produit une dissociation partielle du complexe bilirubine-sérumalbumine sous l'influence de la solution aqueuse, ce qui rend le pigment non conjugué sensible à l'action oxydante de l'acide nitreux.

Nous avons donc essayé de pratiquer la dilution dans du sérum normal.

Partant du sérum très ictérique précédemment utilisé, renfermant 205 mg par litre de pigment total, nous avons réalisé une dilution au demi dans du sérum humain normal. Après oxydation, nous avons dosé la bilirubine non altérée et obtenu les résultats suivants :

Temps de contact (en minutes)	5	10	15	20
Bilirubine non oxydée				
- mg par litre sur la courbe	7	6	5	5
- mg par litre de sérum	28	24	20	20

Le résultat lu sur la courbe doit être multiplié par quatre dans ce cas particulier, puisque dans le volume de 0,4 ml de mélange prélevé après oxydation, nous trouvons :

0,2 ml de réactif phosphonitreux
 0,1 ml de sérum ictérique
 0,1 ml de sérum normal

(la courbe d'étalonnage étant établie, rappelons-le, pour donner directement le résultat en mg par litre, avec une prise d'essai de 0,4 ml).

La valeur obtenue (20 mg par litre) correspond donc :

- à la bilirubine du sérum normal utilisé pour la dilution (5 mg par litre dans ce cas particulier)
- à la bilirubine non oxydable du sérum ictérique.

Pour vérifier que la réaction d'oxydation de la bilirubine conjuguée était terminée, nous avons utilisé un réactif phosphonitreux préparé avec une solution de nitrite de sodium à 0,6 p. 1000 : ce réactif nous a donné exactement le même résultat pour la bilirubine non oxydable.

Les résultats, pour le sérum ictérique utilisé, peuvent donc s'exprimer ainsi :

Bilirubine totale : 205 mg par litre

Bilirubine non conjuguée ("indirecte") $205 - 5 = 15$ mg/l.

Bilirubine conjuguée ("directe") : $205 - 15 = 190$ mg/l.

Nous dirons donc qu'il faut au préalable diluer les sérums très ictériques avec du sérum humain normal (résidu des analyses biologiques) et que le taux de cette dilution sera déterminé en fonction de la valeur trouvée pour la bilirubinémie totale. Pour être sûr de se trouver dans de bonnes conditions, on réalisera une dilution contenant moins de 100 mg de bilirubine totale par litre. On corrigera le résultat trouvé pour tenir compte du pigment non conjugué, apporté par le sérum normal, à l'aide d'un calcul qui sera indiqué avec l'exposé détaillé de la méthode.

5. Cas des sérums ictériques renfermant très peu de bilirubine non oxydable

Il est clair que, dans ce cas, le dosage de la bilirubine non oxydable devient peu précis, puisqu'il est pratiqué sur de très faibles quantités de pigment. On peut alors doubler la sensibilité de la technique en utilisant les proportions suivantes :

	TEMOIN	REACTION
Mélange après oxydation	0,8 ml	0,8 ml.
Solution de caféine	4 ml	4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,2 ml	—
Diazoréactif	—	0,2 ml

Nous rappelons, en effet, qu'avec des taux de bilirubine ne dépassant pas 30 mg par litre dans le liquide d'essai, ici dans le mélange obtenu après oxydation, la densité optique est identique si l'on utilise la quantité habituelle de diazoréactif ou seulement un tiers de celle-ci. En utilisant ces proportions pour le dosage de la bilirubine non oxydable, on se ramène à la méthode classique de dosage, et la lecture de la courbe donne directement le résultat en mg par litre de sérum.

Nous avons en particulier utilisé ce procédé pour vérifier, sur les sérums normaux, la concordance entre la réaction qualitative d'HIJMANS VAN DEN BERGH et notre méthode de dosage de la bilirubine non conjuguée.

6. Colorations obtenues et importance du témoin

Le sérum devenant vert à la suite de l'oxydation (en présence de bilirubine conjuguée), les colorations obtenues sont le résultat de la teinte rouge de l'azoïque, et de la teinte verte du mélange sur lequel est pratiqué le dosage. Il est donc indispensable de mesurer la densité optique du témoin de réactifs dans la longueur d'onde choisie pour le dosage, sa valeur étant différente, et souvent plus élevée que celle du témoin de bilirubine totale.

De plus, le mélange après oxydation contenant un peu d'acide nitreux, nous avons réalisé les mesures comparatives suivantes, avec ou sans acide sulfanilique, pour mettre en évidence des différences éventuelles :

Mélange après oxydation	0,4 ml	0,4 ml
Solution de caféine	4 ml	4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	—
Acide chlorhydrique à 4 p.1000(v/v)	—	0,6 ml

Nous n'avons pas relevé de différences dans les densités optiques, et ceci permet de penser que l'acide nitreux résiduel ne réagit pas sur l'acide sulfanilique dans les conditions opératoires.

Ceci est d'ailleurs logique, puisque les réactions de diazotation ne se réalisent qu'en milieu acide, et que la solution de caféine neutralise le mélange de sérum et de réactif oxydant.

Par conséquent, le témoin de réactifs sera obtenu, comme pour le dosage de la bilirubine totale, en remplaçant le diazoréactif par la solution d'acide sulfanilique.

7. Reproductibilité des résultats

Nous ne donnerons que l'exemple d'un dosage effectué dix fois sur le même sérum ictérique naturel :

Bilirubine totale : 92 mg par litre

Bilirubine non oxydée (en mg par litre) :

Numéro	Réaction	Témoin	Différence	Résultat
1	28	14	14	28
2	28,5	15	13,5	27
3	28	15	13	26
4	27,5	14	13,5	27
5	28	14	14	28
6	28,5	14,5	14	28
7	27	14	13	26
8	28	14,5	13,5	27
9	27,5	14	13,5	27
10	27,5	14	13,5	27

La valeur de la réaction colorée étant connue, cet exemple montre, de façon indiscutable, la régularité de l'oxydation de la bilirubine conjuguée par le réactif phosphonitreux, dans les conditions où nous opérons.

8. Comparaison avec la réaction qualitative d'HLJMANS VAN DEN BERGH

Nous avons pratiqué cette dernière réaction selon le processus classique indiqué par l'auteur :

Mesurer dans deux tubes	TEMOIN	REACTION
Sérum	0,5 (ou 0,4) ml	0,5 (ou 0,4) ml
Eau distillée	0,5 (ou 0,4) ml	0,5 (ou 0,4) ml
Diazoréactif	—	0,25 (ou 0,2) ml

Mélanger et comparer la coloration des deux tubes après 40 secondes.

Nous avons ensuite vérifié que les résultats sont identiques en remplaçant l'eau distillée par la solution d'acide sulfanilique.

Ce dernier point paraît important, puisqu'il nous permet de coupler la réaction qualitative avec le dosage de la bilirubine totale sur la même prise d'essai de sérum :

Mesurer dans deux tubes :	TEMOIN	REACTION
Sérum	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	—
Diazoréactif	—	0,6 ml

Mélanger et comparer les deux tubes après 40 secondes. Noter le résultat et ajouter dans chacun des deux tubes 4 ml de solution de caféine pour le dosage de la bilirubine totale.

Ce procédé n'est cependant utilisable qu'avec du sérum pur (et non avec une dilution dans la solution de chlorure de sodium, qui, comme on le sait, peut faire apparaître une fausse réaction positive).

Après ces essais préliminaires, nous avons choisi un certain nombre de sérums normaux ou peu ictériques, et nous avons pu mettre en évidence une parfaite concordance entre la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH, et notre dosage de la bilirubine non conjuguée.

Nous avons surtout constaté (en faisant chaque fois plusieurs déterminations pour éliminer les erreurs expérimentales), que nous ne trouvons pas de bilirubine conjuguée par la méthode de dosage, lorsque la réaction qualitative est négative dans les conditions indiquées ci-dessus.

Ceci est très intéressant, puisque la réaction d'HIJMANS VAN DEN BERGH, particulièrement facile à mettre en œuvre, permet de séparer rapidement tous les sérums contenant des pigments conjugués, et pour lesquels un dosage de la fraction non conjuguée est nécessaire.

Au terme de cette étude, nous pouvons essayer de dégager quelques conclusions générales sur le mécanisme des deux réactions fondamentales que nous venons de comparer :

- la réaction directe du diazoréactif avec les pigments conjugués du sérum, mise en évidence par HIJMANS VAN DEN BERGH.
- l'oxydation sélective de cette bilirubine à réaction directe par le réactif phosphonitreux, dans les conditions où nous opérons.

On sait que les pigments biliaires se trouvent, dans le sérum, liés à la sérumalbumine, qu'ils soient ou non conjugués. D'autre part, la conjugaison semble empêcher une liaison très étroite entre le pigment et la molécule protéique, puisque cette conjugaison rend la bilirubine plus sensible :

- d'une part à la fixation de l'acide sulfanilique diazoté sur le pont méthylénique central du pigment
- d'autre part à l'action de l'acide nitreux.

Nous n'avons pas étudié la nature des dérivés d'oxydation obtenus après action du réactif phosphonitreux, puisque cela sortait du cadre de ce travail, mais il est possible que cette action porte aussi sur le groupement méthylénique. Nous savons en effet, puisque cette propriété est à la base de notre méthode de dosage de la bilirubine non conjuguée, que les produits d'oxydation ne donnent plus d'azoïque coloré avec l'acide sulfanilique diazoté.

Cette hypothèse permettrait d'autre part d'expliquer les phénomènes observés lorsqu'on travaille, non avec du sérum pur, mais avec un sérum sans réaction directe, préalablement dilué avec la solution isotonique de chlorure de sodium :

- apparition d'une réaction directe
- oxydation d'une partie du pigment

Il est en effet possible que le fait de diluer un sérum, dénature, au moins partiellement, le complexe bilirubine non conjuguée - sérumalbumine, et rende alors possible les réactions avec l'acide sulfanilique diazoté et avec le réactif phosphonitreux.

3°. DISCUSSION

La régularité de l'oxydation semble assurée, la reproductibilité des résultats obtenus sur un même sérum en témoigne. Le fait qu'après 15 minutes la quantité de bilirubine diazotable reste constante, quelles que soient les proportions de pigment conjugué et non conjugué, montre que la réaction utilisée est sélective.

Nous pensons pouvoir affirmer que la bilirubine "indirecte" n'est pas altérée par l'oxydation, puisque nous retrouvons intégralement la bilirubine artificiellement ajoutée à du sérum. Cet argument est d'autant plus valable que le complexe réalisé "in vitro" est moins stable que le complexe naturel (légère réaction directe).

Pour affirmer que la bilirubine oxydée correspond intégralement à la fraction conjuguée, nous nous appuyons sur

la disparition totale de la bilirubine biliaire ajoutée à du sérum. On ne peut prétendre que de tels mélanges sont plus facilement oxydables que les sérums pathologiques, puisqu'avec ces derniers, la réaction est au moins aussi rapide qu'avec des témoins reconstitués. Dans tous nos essais, nous avons constaté qu'après 12 à 13 minutes environ, la quantité de bilirubine non altérée ne diminue plus.

Par conséquent, nous pensons que cette méthode est très largement suffisante pour les besoins de la clinique, et il est certain que les résultats obtenus se rapprochent beaucoup plus des valeurs réelles que ceux fournis par les procédés utilisant l'étude cinétique de la réaction directe, ou l'extraction de la bilirubine non conjuguée.

Cette technique présente en outre l'avantage de fournir sans complication trop grande, dans les conditions dites de routine, des résultats à la fois précis et reproductibles.

Enfin, comme les deux déterminations sont effectuées dans des conditions identiques, il devient possible de calculer la bilirubine conjuguée (ou "directe"), par différence entre le taux de pigment total et celui de pigment non oxydable (ou "indirect"), ce que ne permettaient pas, à notre avis, les méthodes proposées jusqu'à ce jour.

Cependant, bien que cette méthode ait déjà été appliquée avec succès, il faudra attendre, pour la juger définitivement, les conclusions des autres expérimentateurs sur le plan purement technique, et celles des cliniciens qui diront quels renseignements elle est susceptible de leur fournir.

4°. TECHNIQUE PROPOSEE1. Réactifs

En plus de ceux proposés pour le dosage de la bilirubine totale, il faut aussi :

* Solution de nitrite de sodium

Mélanger au moment de l'emploi :

Solution de nitrite de sodium à 0,5 p.100	0,5 ml
Eau distillée	4,5 ml

(la solution de nitrite de sodium à 0,5 p.100 ne doit pas dater de plus d'une semaine).

* Acide phosphorique à 2 p.100 en volumes (acide pur concentré)* Réactif phosphonitreux

Mélanger soigneusement au moment de l'emploi :

Solution de nitrite de sodium à 0,5 p.1000	0,3 ml
Acide phosphorique à 2 p.100	10 ml

(doit être utilisé au cours des trente minutes qui suivent sa préparation).

2. Technique d'oxydation de la bilirubine conjuguéea) sérums avec moins de 100 mg de bilirubine totale par litre

Mesurer dans un tube à essais :

Sérum ictérique	0,5 ml
Réactif phosphonitreux	0,5 ml

Mélanger soigneusement et placer 15 minutes à la température du laboratoire, et à l'obscurité.

b) sérums avec plus de 100 mg de bilirubine totale
par litre

Diluer le sérum ictérique avec du sérum humain normal
(résidu d'analyses biologiques), pour ramener la concentration à moins de 100 mg par litre.

Soit 1/n le titre de la dilution réalisée.

Sur cette dilution, pratiquer la réaction d'oxydation comme précédemment.

REMARQUE : Il est indispensable de réaliser la dilution précédente avec un sérum normal (ne présentant pas de réaction directe positive), et non avec une solution aqueuse.

3. Technique de dosage

a) Pour un sérum NON DILUE avant l'oxydation

* Méthode habituelle

Mesurer dans deux tubes à essais	TEMOIN	REACTION
Solution de caféine	4 ml	4 ml
Mélange obtenu après oxydation	0,4 ml	0,4 ml

Mélanger et ajouter :

Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	-
Diazoréactif	-	0,6 ml

Mélanger et effectuer la lecture photométrique après 2 minutes, dans les mêmes conditions que pour le dosage de la bilirubine totale.

Se reporter à la courbe d'étalonnage et multiplier par 2 pour obtenir le taux de bilirubine non conjuguée en mg par litre de sérum (la courbe est établie pour une prise d'essai de 0,4 ml de sérum).

* Méthode (facultative) s'il y a très peu de bilirubine non conjuguée

Pour augmenter la précision, on peut opérer de la façon suivante :

	TEMOIN	REACTION
Solution de caféine	4 ml	4 ml
Mélange après oxydation	0,8 ml	0,8 ml

Mélanger puis ajouter :

Solution d'acide sulfanilique	0,2 ml	-
Diazoréactif	-	0,2 ml

Dans ce cas, la lecture de la courbe donne directement le résultat en mg de bilirubine non conjuguée par litre de sérum.

b) Pour un sérum DILUE AVANT OXYDATION dans du sérum normal

* Méthode habituelle

Il faut dans ce cas tenir compte de la bilirubine non conjuguée apportée par le sérum normal utilisé pour réaliser la dilution à $1/n$ du sérum ictérique.

Deux dosages seront pratiqués :

- sur 0,4 ml de mélange après oxydation : soient a mg par litre lus sur la courbe
- sur 0,4 ml de sérum normal : soient b mg par litre lus sur la courbe.

La valeur a représente :

- la bilirubine non conjuguée de $\frac{0,2}{n}$ ml de sérum ictérique
- la bilirubine de $(0,2 - \frac{0,2}{n})$ ml = $\frac{0,2}{n} (n - 1)$ ml de sérum normal.

La courbe étant établie pour une prise d'essai de 0,4 ml de sérum, il faudra, pour obtenir le résultat en mg par litre de sérum, multiplier par 2 n.

D'après ce qui précède, le produit $(2n.a)$ représente la somme de :

- la bilirubine (x) du sérum ictérique en mg par litre

- la bilirubine contenue dans 0,4 $(n - 1)$ ml de sérum normal, c'est-à-dire $b (n - 1)$ mg par litre.

On peut donc écrire l'égalité suivante :

$$2 n . a = (x) + b(n - 1)$$

Nous en tirons le résultat cherché :

$$\underline{\underline{(x) = (2n.a) - b(n - 1)}}$$

Cette formule, en apparence compliquée, se simplifie beaucoup si on donne à n les quelques valeurs numériques utilisées en pratique. :

- pas de dilution préalable :

$n = 1$ ce qui donne : $(x) = 2a$ (nous retrouvons la méthode habituelle du paragraphe précédent).

- dilution au 1/2 :

$n = 2$ ce qui donne : $(x) = 4a - b$

- dilution au 1/3 :

$n = 3$ ce qui donne : $(x) = 6a - 2b$

- dilution au 1/4 :

$n = 4$ ce qui donne : $(x) = 8a - 3b$ etc...

* Méthode pour les sérums contenant très peu de pigment non conjugué

Dans ce cas, le dosage de la bilirubine non oxydée se réalise sur 0,8 ml de mélange après oxydation, ce qui correspond à 0,4 ml de sérum dilué.

Si nous désignons par :

- a' mg par litre le résultat de bilirubine non oxydable
lu sur la courbe
- b mg par litre la concentration en pigment du sérum
normal,

la formule de calcul devient alors :

$$\underline{\underline{(x) = (n \cdot a') - b(n - 1)}}$$

On obtient alors, avec les dilutions habituelles :

- sérum non dilué : $(x) = a'$
- sérum dilué au 1/2 : $(x) = 2a' - b$
- sérum dilué au 1/3 : $(x) = 3a' - 2b$ etc...

CONCLUSIONS

1. Les témoins de bilirubine utilisés pour l'étalonnage d'un appareil en vue du dosage des pigments biliaires du sérum doivent être préparés avec le plus grand soin, dans les conditions que nous avons définies, pour conserver à la bilirubine sa propriété fondamentale de donner un azoïque coloré avec l'acide sulfanilique diazoté.

2. Dans le dosage de la bilirubine totale, les réactifs à base de benzoate de sodium et de caféine sont les plus commodes pour "révéler" la fraction dite indirecte. Les solutions qu'ils donnent sont toujours limpides lorsqu'on utilise une formule définie de diazoréactif. Cette réaction est très sensible, et il est nécessaire de réaliser, avant le dosage, une dilution connue des sérums très icteriques dans la solution isotonique de chlorure de sodium.

3. Nous proposons, sur ce principe, une méthode de dosage très simple qui permet de connaître le taux de bilirubine sérique avec une erreur absolue inférieure à 2 mg par litre, ce qui correspond à l'erreur habituelle dans les mesures par colorimétrie.

4. Les méthodes basées sur la réaction directe d'HJLMANS VAN DEN BERGH, proposées pour le dosage de la bilirubine conjuguée, doivent être proscrites car de nombreux facteurs interviennent. Le plus important semble la propriété de la bilirubine non conjuguée de réagir avec le diazoréactif après un certain délai, en l'absence de tout réactif "révélateur", par suite de la dilution importante pratiquée sur le sérum.

5. Les méthodes proposées pour doser la bilirubine non conjuguée, après extraction par un solvant organique, sont assez mal définies, et surtout ne sont pas quantitatives.

6. Il est possible de dénaturer sélectivement la bilirubine conjuguée du sérum par des mélanges oxydants à base d'acide nitreux (utilisés dans des conditions bien définies), et de doser la fraction non oxydée qui correspond à la bilirubine non conjuguée. Nous proposons, basée sur ce principe, une méthode simple qui, d'après nos expériences, semble satisfaisante sur le plan théorique et dans ses applications pratiques (sélectivité, précision, fidélité).

7. Il est possible à la suite de ce travail de formuler quelques hypothèses plus générales sur les pigments biliaires du sérum :

* Le comportement différent des deux fractions de bilirubine vis-à-vis de l'acide sulfanilique diazoté, pourrait s'expliquer par des liaisons plus ou moins étroites avec la sérumalbumine. Dans le cas de la bilirubine non conjuguée, la nature de ces liaisons s'opposerait à une réaction rapide avec le diazoréactif.

* Le réactif oxydant (phosphonitreux), semble réagir avec la molécule de pigment au même endroit que le diazoréactif, c'est-à-dire sur le pont méthylénique central. Ceci expliquerait pourquoi le pigment oxydé ne réagit plus avec l'acide sulfanilique diazoté.

* La dilution d'un sérum avec une solution aqueuse (telle que la solution de chlorure de sodium à 9 g par litre), semble provoquer une dénaturation plus ou moins complète du complexe pigment-sérumalbumine. Ceci permet alors à la bilirubine non conjuguée de réagir avec le diazoréactif et le réactif phosphonitreux, ce qui ne se produit pas si on utilise le même sérum non dilué.

* On pourrait aussi expliquer par une dissociation de ce complexe bilirubine-sérumalbumine, l'action des réactifs (en particulier à base de caféine), qui permettent à la fraction non conjuguée de réagir très rapidement avec l'acide sulfanilique diazoté au cours du dosage de la bilirubine totale du sérum.

Vu, le Doyen :

H. HERMANN

Le Président de la Thèse :

Pr. DORCHE

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 18 Octobre 1961

Le Recteur, Président
du Conseil de l'Université,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

Cette bibliographie groupe les travaux les plus importants, et en particulier, comme nous l'avons dit page 23, les seules méthodes de dosage de la bilirubinémie totale pratiquées à un pH voisin de la neutralité.

1. BARAC (G) Bull. Soc. Chim. Biol. (1939), 21, 1163. Stabilisation et dosage de la bilirubine totale dans le liquide duodénal.
2. BARAC (G) C. R. Soc. Biol. (1945), 139, 412. Dosage de la bilirubine dans l'urine par photométrie et par diazo-réaction.
3. BARAC (G) C. R. Soc. Biol. (1945), 139, 414. Bilirubinémie totale et élimination rénale de la bilirubine chez l'homme normal et chez le sujet ictérique.
4. BARAC (G) C. R. Soc. Biol. (1946), 140, 578. Influence de l'eau oxygénée sur la stabilité de la bilirubine dans divers milieux alcalins.
5. BARAC (G) C. R. Soc. Biol. (1946), 140, 901. Ultrafiltrat de plasma, liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse et stabilisation antioxygénée de la bilirubine.
6. BARAC (G) C. R. Soc. Biol. (1946), 140, 1222. Sur la cénapse albumino-biliverdinique.
7. BARAC (G) Bull. Soc. Chim. Biol. (1946), 28, 633. Nouvelles données sur la cénapse albumino-bilirubinique.
8. BARAC (G) Bull. Soc. Chim. Biol. (1947), 29, 96. Cénapse albumino-bilirubinique et élimination rénale de la bilirubine.
9. BARAC (G) Bull. Soc. Chim. Biol. (1949), 31, 876. Sur la solubilité de quelques dérivés alcalins de la bilirubine et l'état de la bilirubine dans l'urine ictérique.
10. BARAC (G) Acta Clin. Belg. (1957), 12, 307. Standardisation et dosage de la bilirubine plasmatique totale.

11. BARAC (G), BUSSET (R), GEISER (M) C. R. Soc. Biol. (1947), 141, 947. Acide ascorbique et stabilisation antioxygénée de la bilirubine en milieu alcalin.
12. BARAC (G), GERNAY (J.M.) Bull. Soc. Chim. Biol. (1949), 31, 128. Recherches sur la cénapse albumino-bilirubinique.
13. BARAC (G), ROSEMAN (R) C. R. Soc. Biol. (1946), 140, 581. Sur la stabilisation antioxygénée de la bilirubine par les acides aminés.
14. BARAC (G), ROSEMAN (R) C. R. Soc. Biol. (1946), 140, 899. Sur la stabilisation de la bilirubine en milieu alcalin par les acides aminés et les protéines.
15. BAUMGARTEL (Tr) Physiologie und Pathologie des bilirubin Stoffwechsels als grundlagen der icter-noforschung. G. Thieme Stuttgart 1950 (cité par 52).
16. BENARD (H), GADJOS (A), TISSIER (A) Hémoglobine et pigments apparentés. Masson 1949. (méthode de dosage de la bilirubine page 287).
17. BENARD (H), TISSIER (M), POLONOVSKI (M), GADJOS (A) C. R. Soc. Biol. (1949), 143, 1520 et 1579. Spectrophotométrie de la bilirubine dans les milieux biologiques.
18. BENHAMOU (J.P.), BESSON (R) Sem. Hôp. Path. et Biol. (1959), 7, 111. Le dosage de la bilirubine benzéno-extractible du sérum. Technique et résultats.
19. BESSON (R), FAUVERT (R) Rev. Fr. Et. Clin. Biol. (1958), 3, 673. Dosage de la bilirubine benzéno-extractible.
20. BILLING (B.H.) J. Clin. Path. GB (1955), 8, 126.
A chromatographic method for the determination of the three bile pigments in serum.
21. BILLING (B.H.) Advances in clinical chemistry (1959) 2, 267. Bile pigments in jaundice.
22. BOREAU (T), DAVID (G) Presse Med. (1957), 64, 715.
Indications de l'exsanguinotransfusion.
23. BOURRILLON (R) Bull. Soc. Chim. Biol. (1956), 38, 675. Interactions de la bilirubine avec les protéines sériques.

24. BOURRILLON (R) Bull. Soc. Chim. Biol. (1957), 39, 385.
Isolement et propriétés du complexe bilirubine-sérumalbumine du sérum.
25. BOURRILLON (R) Ann. Biol. Clin. (1958), 16, 3. Transport de la bilirubine dans le plasma.
26. BOURRILLON (R) Sem. Hôp. Path. et Biol. (1958), 6, 1503.
Les complexes bilirubino-albumine du plasma et la réaction diazoïque.
27. BOURRILLON (R) Bull. Soc. Chim. Biol. (1958), 40, 111.
Analyse spectrophotométrique de la bilirubine plasmatique.
28. CHABROL (E), BENARD (H), GAMBILLARD (M) Bull. Soc. Med. Hôp. Paris. 15 déc. 1922. (cité par 33).
29. CHABROL (E), BOSZORMENYI (M), FALLOT (P) Sem. Hôp. (1949), 25, 3437. Les oxydoréactions de la bilirubine.
30. CHABROL (E), CHARONNAT (R), BUSSON (A) C. R. Soc. Biol. (1931), 107, 606. La valeur sémiologique de la réaction d'Hijmans Van Den Bergh.
31. CHABROL (E), CHARONNAT (R), BUSSON (A) C. R. Soc. Biol. (1931), 107, 608. La diazoréaction-limite pratiquée directement sur le sérum sanguin.
32. CHABROL (E), CHARONNAT (R), BUSSON (A) C. R. Soc. Biol. (1931), 107, 692. Etude comparative des différentes méthodes cholémimétriques.
33. CHABROL (E), CHARONNAT (R), BUSSON (A) Presse Med. (1932), 40, 193. Le dosage des pigments biliaires du sang. La diazoréaction-limite.
34. CHABROL (E), CHARONNAT (R), DANY C.R. Soc. Biol. (1931), 106, 269. Recherches sur la diazoréaction-limite.
35. CHARBONNIER (A) Ann. Biol. Clin. (1958), 16, 247.
Compte-rendu des discussions des Journées de Biologie Clinique. Paris 22 et 23 Novembre 1957.
36. CHARBONNIER (A) Ann. Biol. Clin. (1958), 16, 263. Etude critique du dosage de la bilirubine sérique.
37. CHARBONNIER (A), BAESSENS (J), CAROLI (J) Ann. Biol. Clin. (1953), 11, 303. Apport de l'électrophorèse des protides sériques dans le diagnostic différentiel des ictères.

38. CHARBONNIER (A), FARON (G), MERLINI (A), SERT (J) 3^o
Coll. Sint Jans Hospitaal Brugge 1955. Etude expérimentale sur l'état de la bilirubine dans le sérum.
39. CHARBONNIER (A), MENDIOROZ (B.A.), VARELA RODRIGUEZ (J)
Arch. Mal. Appar. digest. Mal. Nutrit. (1955), 44; 466
Etude chromatographique de la bilirubine sérique.
40. COLE (P.G.), LATHE (G.H), BILLING (B.H) Bioch. J.
(1954), 57, 514. Separation of the bile pigments of
serum, bile and urine.
41. COLLENSON (G.A), FOWWEATHER (P.S) Brit. Med. J. (1927)
1, 1081. Explanation of the two forms of bilirubin
demonstrated by the Van Den Bergh reaction.
42. CORA (D) Acta med. Scand. (1954), 149, 475. The influence
of diluting sera from cases of jaundice upon the
diazoreaction.
43. COTTE (J), MALLEIN (R) Electrophotomètre de Meunier.
Jobin et Yvon Ed. Dosage de la bilirubine totale.
44. DE JONG (B) Dtsch. Arch. Klin. Med. (1943), 190, 229.
Ueber den Unterschied zwischen mechanischen und
dynamischen Bilirubin und ihre Eigenschaften sowie
ein diesbezüglicher Deutungsversuch. (cité par 16).
45. DEMANGE (G), BALLAN (P), MORETTI (G.F), STAEFFEN (J)
Ann. Biol. Clin. (1959), 17, 88. Durable valeur de la
technique originale de Malloy et Evelyn avec lecture
de la bilirubine directe trente minutes après addition
du diazoréactif.
46. DORCHE (J), MONNET (L) Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon.
(1958) 2, 59. Sur le dosage de la bilirubinémie dite
"directe".
47. DORCHE (J), ROLLET (M) Bull. Soc. Chim. Biol. (1955),
37, 739. Etude spectrophotométrique de l'extrait
étheré de quelques sérums ictériques.
48. DUCCI (H), WATSON (C.J) J. of Lab. and Clin. Med.
(1945), 30, 293. The quantitative determination of
the serum bilirubin with special reference to the
prompt-reacting and the chloroform-soluble types.
49. DULIERE (W.L), MINNE (R) C. R. Soc. Biol. (1937), 126,
440. Substances quantitativement entraînées avec les
protéines sériques dans la précipitation par l'acide
trichloracétique et dans l'ultrafiltration.

50. ENACHESCO (M), COMANESCO (V), ZAMFIRESKO (M) Presse Med. (1947), 55, 17. Recherches sur l'élimination de la bilirubine dans les ictères.
51. ENACHESCO (M), COMANESCO (V), ZAMFIRESKO (M) Presse Med. (1947), 55, 63. La rétention de la bilirubine dans les ictères en fonction de la constitution chimique de la bilirubine.
52. FALLOT (P) Rev. Internat. Hépatol. (1958), 8, 303. De la nature des bilirubines "directe" et "indirecte".
53. FAUVERT (R), BENHAMOU (J.P.) Rev. Fr. Et. Clin. et Biol. (1958), 3, 539. Une solution attendue depuis cinquante ans : celle du problème des bilirubines "directe" et "indirecte".
54. FAUVERT (R), BENHAMOU (J.P.) Ann. Biol. Clin. (1958), 16, 127. Etude statique et dynamique de la bilirubine indirecte du sérum.
55. FIESSINGER (N), GADJOS (A), POLONOVSKI (M) C. R. Soc. Biol. (1942), 136, 714. Sur la bilirubinoglobine et la globine libre du plasma sanguin.
56. FIESSINGER (N), JOURDAIN (V), TOIZOUL (D) Presse Med. (1929), 37, 1245. Contribution à l'étude de la bilirubine dissimulée en circulation sanguine.
57. FIESSINGER (N), WALTER Nutrition (1931), 1, n°3. La bilirubimétrie plasmatique. (cité par 33).
58. FRANZINI (P), MONTI (A.M) Arch. Patol. clin. med. (1954) 31, 284. Considerazioni a proposito delle reazioni di H. V. D. Bergh e del dosaggio bilirubinemico frazionato.
59. FRIEDMAN (H.S) Clin. Chem. USA (1956), 2, 160. Azorubin in aqueous and methanolic solutions. Spectrophotometric studies.
60. GILBERT (A), HERSCHER (M), POSTERNAK (S) C. R. Soc. Biol. 12 déc. 1903, 1587. Sur un procédé de dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin (cholémimétrie). (cité par 29).
61. GRAY (C.H), WHIDBORNE (J) Bioch. J. (1946), 40, 81. Studies of the VDB reaction. et Bioch. J. (1947), 41, 155. Further studies of the VDB reaction. (cités par 29).

62. GRODSKY (G.M), CARBONE (J.V) J. Biol. Chem. (1957) 226,449. The synthesis of bilirubinglucuronide by tissue homogenates. (cité par 52).
63. GUILLAUMIN (C.O) Bull. Soc. Chim. Biol. (1939),21, 127. Sur le dosage de la bilirubine du sérum sanguin.
64. HASLEWOOD et KING Bioch. J. (1937),31,920. in "Techniques pour photolorimètres Electrosynthèse"
65. HAYASHI (H) Presse Med. (1929),37,720. Etude de la réaction de Van Den Bergh sur la bilirubine du sang.
66. HIJMANS VAN DEN BERGH (A), GROTEPASS (W) Brit. Med. J. (1934),1,1157. An improved method for the determination of bilirubin in blood.
67. HOFFMAN (H.N), WHITCOMB (F.F), BUTT (H.R), BOLLMAN(J. L) J. Clin. Invest. (1960),39,132. Bile pigments in jaundice.
68. ISSELBACHER (K.J) J. Clin. Invest. (1958),37,904. The demonstration of bilirubin sulfate in bile.
69. ISSELBACHER (K.J), Mc CARTHY (E.A) J. Clin. Invest. (1959),38,645. Studies on bilirubin sulfate and other nonglucuronide conjugates of bilirubin.
70. JENDRASSIK (A.C) Dtsch. Med. Woch. (1928),n°11. Bestimmung des Blut Bilirubins (cité par 56).
71. JENDRASSIK (L), CLEGHORN (R.A) Bioch. Ztschr. (1936),289,1. Photometrische Bilirubinbestimmung.
72. JENDRASSIK (L), GROF (P) Bioch. Ztschr. (1938),296, 71. Verfahren zur photometrischen Bestimmung des Bilirubins im Harn.
73. JENDRASSIK (L), GROF (P) Bioch. Ztschr. (1938),297, 81. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins.
74. JIRSA (M), JIRSOVA (V) Clin. Chem. USA (1959),5, 532. Spectrophotometric behaviour of azobilirubin and azotaurobilirubin.
75. JOUVENCEAUX (A), REVOL (L) Presse Med. (1957),65, 1440. A propos du traitement et de la surveillance de la maladie hémolytique du nouveau-né. Micro- (et macro-) dosage de la bilirubine.

76. KILCHLING (H), KUHN (H.A) Z. ges. exper. Med. (1951), 117,481. Diazoréaktion eiweissfreier Bilirubinlösungen.
77. LAMBRECHTS (R), BARAC (G) Bull. Soc. Chim. Biol. (1939),21,1171. Le spectre de la bilirubine en milieu alcalin.
78. LINS (M) Arq. Biol. Bras. (1951),35,78. Empiêgo do diazoico de 4-4' diamino - difenil - sulfona na dosagem de bilirrubina, com o colorimetro foto-electrico.
79. MALLOY (H.T), EVELYN (K.A) J. of Biol. Chem. (1937), 119,481. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter.
80. MENDIOROZ (B.A), CHARBONNIER (A) C. R. Soc. Biol. (1951),145,1480. Rôle des sels biliaires sur la diazoreaction de la bilirubine.
81. MENDIOROZ (B.A), CHARBONNIER (A), BERNARD (R) C. R. Soc. Biol. (1951),145,1483. Etude chromatographique de la bilirubine en solution pure.
82. MEULENGRACHT Dtsch. Arch. Klin. Med. (1920);132,285. Die klinische Bedeutung der Untersuchung auf Gallenfarbstoff im Blutserum. (cité par 36).
83. MONCKE (C) Z. ges. inn. Med. Grenzgeb. (1952),7,238. Ein Beitrag zur eiweissfehlerfreien Bilirubinbestimmung im Serum.
84. MORETTI (G.F), STAEFFEN (J), DEMANGE (G), BALLAN (P) Sem. Hôp. (1960),36,2031. Bilirubinémies directe et indirecte. Persistant intérêt de la technique de Malloy et Evelyn pour leur dosage. Données fournies et problèmes posés par 120 déterminations chez 50 ictériques.
85. PITTERA (A) Boll. Soc. ital. Biol. sper. (1957),33,388. Differenze spettrofotometriche fra sieri normali e sieri itterici in rapporto a diversi solventi.
86. PITTERA (A), CASSIA (B) Boll. Soc. ital. Biol. sper. (1957),33,396. Separazione cromatografica su carta dei pigmenti biliari dal sangue e dalle urine di soggetti itterici.

87. PITTERA (A), CASSIA (B) Boll. Soc. ital. Biol. sper. (1957), 33, 1296. Bilirubina indiretta e diretta. Studio cromatografico su sieri ed urine itteriche. I. Siero.
88. POLONOVSKI (C), COLIN (J) Les explorations biologiques en pédiatrie. Exp. Sc. Fr. 1955. Dosage de la bilirubine dans le sang p. 28.
89. POLONOVSKI (M), BOURRILLON (R) Bull. Soc. Chim. Biol. (1952), 34, 963. Métabolisme de la bilirubine. I. Etat physico-chimique de la bilirubine plasmatique.
90. POLONOVSKI (M), BOURRILLON (R) Bull. Soc. Chim. Biol. (1952), 34, 973. Métabolisme de la bilirubine. II. Etat physico-chimique de la bilirubine dans la bile.
91. POLONOVSKI (M), BOURRILLON (R) Bull. Soc. Chim. Biol. (1952), 34, 985. Métabolisme de la bilirubine. III. Elimination rénale.
92. POWELL (W.N) Am. J. of Clin. Path. (1944), 8, 55. A method for the quantitative determination of serum bilirubin with the photoelectric colorimeter.
93. RAPPAPORT (F), EICHHORN (F) Lancet (1943), 244, 62. A note on the estimation of serum bilirubin and sulphanilamide. (cité par 29, 36, 92).
94. RIVOIRE (R) Ann. Med. (1946), 47, 197. Bilirubine directe et bilirubine indirecte. Quelques faits nouveaux.
95. SCHACHTER (D) J. Lab. and Clin. Med. (1959), 53, 557. Estimation of bilirubin mono- and diglucuronide in the plasma and urine of patients with nonhemolytic jaundice.
96. SCHALM, SCHULTE (M.J) Am. J. Med. Sc. (1950), 219, 606. The quantitative determination of the two types of bilirubin simultaneously present in the blood and its clinical importance. (cité par 35 et 110).
97. SCHMID (R) Rev. Internat. Hépat. (1958), 8, 325. Ictères et métabolisme de la bilirubine.
98. SIRJEAN (G) Encyclopédie de Biologie Médicale. Exploration fonctionnelle du foie (cahier n° 15).

99. VARELA (B), APOLO (E), VIANA (C) C.R. Soc. Biol.
(1931), 108, 1014. Résultats obtenus avec la nouvelle
méthode pour le dosage séparé des bilirubines di-
recte et indirecte dans les sérums ictériques.
100. VARELA-FUENTES (B), RECARTE (P) C. R. Soc. Biol.
(1934), 116, 1193. Nouvelle technique simplifiée pour
le dosage séparé des deux bilirubines directe et
indirecte des sérums ictériques.
101. VARELA-FUENTES (B), RECARTE (P) C. R. Soc. Biol.
(1934), 117, 900. Solution colloïdale de bilirubine
acide. Méthode de préparation et propriétés.
102. VARELA (B), RECARTE (P), ESCULIES (J) C. R. Soc. Biol.
(1931), 108, 1009. Méthode simplifiée pour la sépa-
ration et le dosage isolé des deux bilirubines di-
recte et indirecte du sérum sanguin dans les ictères.
103. VARELA (B), RECARTE (P), RUBINO (P) C. R. Soc. Biol.
(1934), 115, 1661. Méthode pour le dosage de la bili-
rubine dans la bile.
104. VARELA-FUENTES (B), RUBINO (P) C. R. Soc. Biol. (1932)
111, 527. Capacité d'absorption du sérum sanguin
pour la bilirubine pure.
105. VARELA (B), VIANA (C) C. R. Soc. Biol. (1933), 114,
786. A propos d'une nouvelle forme de bilirubine
indirecte du sérum ictérique : la bilirubine éthé-
ro- extractible.
106. VARELA (B), VIANA (C) C. R. Soc. Biol. (1933), 114, 789.
De la nature de la bilirubine éthéro-extractible de
quelques sérums ictériques.
107. VARELA (B), VIANA (C) C. R. Soc. Biol. (1934), 115,
1657. Résultat du dosage isolé des deux bilirubines
directe et indirecte du sérum, dans les ictères aigus
à évolution froide (ictères catarrhaux, ictères néo-
plasiques, cholédolithiasiques, sans infection).
108. VARELA-FUENTES (B), VIANA (C) C. R. Soc. Biol. (1934),
116, 1187. Les bilirubines directe et indirecte du
sérum, dans les ictères aigus fébriles et dans les
ictères chroniques. Valeurs données par leur dosage
séparé.

109. VARELA-FUENTES (B), VIANA (C), RECARTE (P) C. R. Soc. Biol. (1934), 117, 903. La bilirubine indirecte du sérum et son extraction par le chloroforme. Discussion des techniques proposées par De Castro et par Kerpola et Leikola.
110. VERSCHURE (C.M.) Ann. Biol. Clin. (1958), 16, 119. L'importance de la bilirubine dans la clinique médicale.
111. WESTPHAL (U), GEDIGK (P) Z. physiol. Chem. (1948), 283, 161. Zur Frage der Bindung der Bilirubins an die Serumproteine.
112. WITH (T.K) Ann. Biol. Clin. (1958), 16, 13. Les bilirubines directe et indirecte. Données récentes sur leur biochimie et leur signification clinique.
113. WHITE (F.D), DUNCAN (D) Canad. J. med. Sci. (1952), 30, 552. Photometric studies on the diazoreaction for serum bilirubin.
114. YI-YUNG HSIA (M.D), HSIA (A.D), GELLIS (S.S.) J. of Lab. and Clin. Med. (1952), 40, 610. A micromethod for serum bilirubin.
-

ADDENDUM

METHODES PROPOSEES POUR L'ANALYSE
D'UN SERUM ICTERIQUE

1°. PREPARATION DES TEMOINS TITRES EN BILIRUBINE EN VUE
DE L'ETALONNAGE D'UN ELECTROPHOTOMETRE

1. Préparation d'une solution aqueuse à 400 mg de bilirubine par litre

Peser 20 mg de bilirubine (récente ou conservée dans de bonnes conditions), sur un verre de montre, ou mieux sur un papier glacé, car le pigment adhère au verre.

Introduire la prise d'essai dans un ballon jaugé de 50 ml muni d'un bouchon de verre ou de caoutchouc.

Mesurer alors 2 ml de soude 0,1 N en entraînant la totalité de la bilirubine restée sur les parois, et ajouter encore 4 à 5 ml d'eau distillée.

Boucher le ballon et agiter d'un mouvement circulaire en évitant la formation de mousse, toujours très difficile à éliminer ensuite, et très gênante pour compléter le volume au trait de jauge.

Au bout de 1 à 2 minutes, vérifier avec le plus grand soin que la dissolution est totale (pas de grains en suspension et liquide parfaitement limpide).

Compléter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée ajoutée par petites fractions en mélangeant prudemment

pour éviter la mousse. Homogénéiser ensuite très soigneusement sans précautions particulières.

Cette solution ne se conserve pas et doit être utilisée immédiatement.

2. Préparation de la solution-mère dans du sérum (Solution A)

Recueillir un mélange de sérums normaux (résidus d'analyses biologiques), 25 ml environ, et le filtrer soigneusement sur papier. Le mélange, non filtré, peut se conserver une semaine au réfrigérateur. On peut aussi utiliser le sérum provenant d'un même donneur sain.

Mesurer dans un tube à essais :

Solution aqueuse à 400 mg/l.	2 ml (1 volume)
Sérum ou mélange de sérums	8 ml (4 volumes)

Ce sérum reconstitué contient donc par litre :

- la bilirubine apportée par la solution aqueuse c'est-à-dire 80 mg
- la bilirubine apportée par le sérum, que nous désignerons par x mg.

Sa concentration totale est donc de :
 $80 + x$ mg par litre.

3. Préparation des sérums témoins

Les dilutions de la Solution A doivent être effectuées avec un sérum renfermant x mg de bilirubine par litre, c'est-à-dire qu'il faudra ajouter à 4 volumes de sérum pur, 1 volume de solution aqueuse isotonique.

Ces conditions sont réalisées par le mélange suivant ou Solution B :

Solution de chlorure de sodium à 9 g/l	3 ml
Sérum (le même que pour la Solution A)	12 ml

Pour obtenir des concentrations comprises entre 10 et 80 mg par litre, on utilisera les valeurs groupées dans le tableau suivant :

N° de la dilution	Solution A (en ml)	Solution B (en ml)	Concentration obtenue(mg/l)
1	0,4	2,8	10 + x
2	0,8	2,4	20 + x
3	1,2	2	30 + x
4	1,6	1,6	40 + x
5	2	1,2	50 + x
6	2,4	0,8	60 + x

Avec les volumes indiqués ci-dessus, l'étalonnage d'un photomètre est réalisable avec seulement 21 ou 22 ml de sérum ou de mélange de sérums, ce qui nous semble possible dans tout laboratoire. Ces dilutions peuvent être conservées au moins 48 heures au réfrigérateur sans altération du pigment. Cependant, comme il peut se produire une légère floculation (lorsqu'on utilise un mélange de sérum), nous conseillons de construire sans attendre la courbe d'étalonnage.

Si l'on veut obtenir une gamme plus étendue de témoins (pour une microméthode par exemple), il suffit de préparer une Solution A plus concentrée, de modifier la proportion de sérum dans la solution B, et de calculer un autre tableau de dilutions.

Pour la construction de la courbe d'étalonnage, la réaction colorée choisie pour le dosage, sera pratiquée sur chacune des six dilutions, ainsi que sur la Solution B qui représente la quantité de bilirubine apportée par le sérum. Cette quantité, que nous avons désignée par x mg par litre, doit être déduite de tous les témoins pour obtenir les correspondances exactes entre les graduations de l'appareil utilisé et la bilirubine ajoutée artificiellement (10, 20.... mg par litre), correspondances nécessaires pour construire la courbe d'étalonnage.

2°. REACTIFS* Solution d'acide sulfanilique (Solution A)

Acide sulfanilique	1 g
Acide chlorhydrique à <u>25 p.100</u> en volumes	15 ml
Eau distillée	100 à 200 ml

Dissoudre complètement en agitant (ce qui peut demander plusieurs jours si on ne dispose pas d'un agitateur mécanique).

Transvaser dans un ballon jaugé de 1 litre, rincer et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

* Solution de nitrite de sodium (Solution B)

Nitrite de sodium	0,50 g
Eau distillée	QSP 100 ml

Ce réactif, altérable, doit être renouvelé chaque semaine.

* Diazoréactif

Mélanger au moment de l'emploi, et dans cet ordre, les solutions précédentes :

Solution B	0,3 ml
Solution A	10 ml

Ce réactif doit être rejeté 30 minutes après sa préparation.

* Solution de caféine

Benzoate de sodium purifié PROLABO (27.694)	75 g
Eau distillée	400 ml environ

Dissoudre et ajouter :

Caféine finement pulvérisée, par petites portions	50 g
Acétate de sodium	125 g

Dissoudre et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

(NB. Il importe d'utiliser un benzoate de sodium purifié, et de ne pas chauffer la solution pour éviter l'apparition d'une coloration jaune).

* Solution de chlorure de sodium

Solution isotonique habituelle à 9 g par litre.

* Solution diluée de nitrite de sodium

Diluer au moment de l'emploi la Solution B précédente pour obtenir une concentration de 0,50 g par litre.

* Acide phosphorique à 2 p. 100 en volumes (acide pur concentré)

* Réactif phosphonitreux

Mélanger soigneusement au moment de l'emploi :

Solution diluée de nitrite de sodium à 0,5 p. 1000	0,3 ml
Acide phosphorique à 2 p.100	10 ml

Ce réactif doit être rejeté 30 minutes après sa préparation.

3°. CONSTRUCTION DE LA COURBE D'ETALONNAGE

Sur la solution B et sur chacun des 6 témoins, pratiquer la réaction suivante :

	TEMOIN	REACTION
Solution B ou témoin	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	—
Diazoréactif	—	0,6 ml
Solution de caféine	4 ml	4 ml

Mélanger par renversement, et mesurer les densités optiques obtenues :

- la coloration est stable entre 3 et 15 minutes
- l'écran doit avoir un maximum de transmission compris entre 530 et 560 m μ .
- pour l'appareil de MEUNIER : cuve de 1 cm, diaphragmes à 10
- pour l'appareil ELECTROSYNTHESE : tubes calibrés grand modèle

Dans chaque cas, retrancher la densité optique du témoin de réactifs de celle obtenue avec le tube réaction.

Le tableau ci-dessous résume les opérations à effectuer :

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Témoins	Concentration en mg/litre	Densité optique ou graduations
Sol. B	x	$R_x - T_x = (B)$
1	10 + x	$R_1 - T_1 = (1)$
2	20 + x	$R_2 - T_2 = (2)$
3	30 + x	$R_3 - T_3 = (3)$
4	40 + x	$R_4 - T_4 = (4)$
5	50 + x	$R_5 - T_5 = (5)$
6	60 + x	$R_6 - T_6 = (6)$

CONSTRUCTION DE LA COURBE

Témoins	Densité optique ou graduations	Concentration en mg/litre
Sol. B	(B) - (B)	0
1	(1) - (B)	10
2	(2) - (B)	20
3	(3) - (B)	30
4	(4) - (B)	40
5	(5) - (B)	50
6	(6) - (B)	60

4°. REACTION QUALITATIVE ET DOSAGE DE LA BILIRUBINE TOTALE

Deux cas sont à envisager :

1. Le sérum est peu ictérique (en apparence moins concentré que le témoin correspondant à la limite supérieure de la loi de BEER-LAMBERT).

2. Le sérum est très ictérique.

1. Le sérum est peu ictérique

Dans ce cas, il est possible de coupler la réaction qualitative et le dosage.

Mesurer dans deux tubes :	TEMOIN	REACTION
Sérum ictérique	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	-
Diazoréactif	-	0,6 ml

Mélanger et observer la coloration des deux tubes : une coloration rose dans le tube réaction indique la présence de bilirubine conjuguée, (lecture après 40 secondes).

Noter le résultat et ajouter dans chaque tube :

Solution de caféine	4 ml
---------------------	------

Mélanger et mesurer la densité optique comme précédemment; faire la différence entre les valeurs fournies par les deux tubes et se reporter à la courbe d'étalonnage qui donne directement la bilirubinémie en mg par litre de sérum.

N.B. Si la densité optique trouvée pour le dosage dépasse les limites de la courbe d'étalonnage, il faudra recommencer la détermination selon le processus indiqué ci-dessous, mais sans recommencer la réaction qualitative.

2. Le sérum est très ictérique

Dans ce cas, le dosage sera pratiqué sur le sérum préalablement dilué, de façon connue, dans la solution de chlorure de sodium. Le résultat lu sur la courbe sera multiplié par le taux de la dilution utilisée (il convient de ne pas pratiquer systématiquement une dilution importante si l'on veut conserver à la méthode une précision suffisante).

La réaction qualitative doit toujours être réalisée sur du sérum pur, on utilisera le processus suivant :

Mesurer dans deux tubes :	TEMOIN	REACTION
Sérum <u>pur</u>	0,4 ml	0,4 ml
Eau distillée	0,6 ml	0,4 ml
Diazoréactif	-	0,2 ml

Mélanger et comparer la coloration des deux tubes après 40 secondes de contact.

5°. DOSAGE DE LA BILIRUBINE NON CONJUGUEE (indirecte)

Deux cas sont à envisager selon la concentration en bilirubine totale du sérum :

- moins de 100 mg par litre : on utilise le sérum pur.
- plus de 100 mg par litre : on utilise le sérum préalablement dilué dans du sérum normal (résidu d'analyses biologiques).

1. Sérums avec moins de 100 mg de bilirubine totale par litre

Oxydation

Mesurer dans un tube à essais :

Sérum ictérique	0,5 ml
Réactif phosphonitreux	0,5 ml

Mélanger soigneusement et placer 15 minutes à l'obscurité, à la température du laboratoire.

Dosage

Mesurer dans deux tubes à essais :	TEMOIN	REACTION
Solution de caféine	4 ml	4 ml
Mélange obtenu après oxydation	0,4 ml	0,4 ml

Mélanger et ajouter :

Solution d'acide sulfanilique	0,6 ml	—
Diazoréactif	—	0,6 ml

Mélanger et effectuer la lecture photométrique après 2 minutes, dans les mêmes conditions que pour le dosage de la bilirubine totale.

Se reporter à la courbe d'étalonnage et multiplier par 2 pour obtenir le résultat en mg par litre de sérum (0,4 ml de mélange après oxydation correspondent à 0,2 ml de sérum).

2. Sérums avec plus de 100 mg de bilirubine totale par litre

Diluer le sérum ictérique avec du sérum humain normal, pour ramener la concentration à moins de 100 mg par litre. Soit $1/n$ le titre de la dilution réalisée.

Oxydation

Se pratique comme ci-dessus à partir de la dilution de sérum ictérique.

Dosage

Deux dosages sont nécessaires :

- sur 0,4 ml de mélange après oxydation : soient a mg par litre lus sur la courbe
- sur 0,4 ml de sérum normal : soient b mg par litre lus sur la courbe

La valeur représentée par a correspond à la somme de :

- * la bilirubine non conjuguée de 0,2/n ml de sérum ic-
térique
- * la bilirubine de $(0,2 - 0,2/n)$ ml = $0,2/n (n-1)$ ml de
sérum normal.

Si (x) est la bilirubine non conjuguée du sérum ic-
térique, le calcul donne :

$$(x) = (2n.a) - b(n - 1)$$

Pour les dilutions habituelles :

$$n = 2 : (x) = 4a - b$$

$$n = 3 : (x) = 6a - 2b$$

$$n = 4 : (x) = 8a - 3b \quad \text{etc..}$$

6°. BILIRUBINE CONJUGUEE : par différence.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
TRAVAUX ANTERIEURS	
* <u>Rappel de biochimie concernant les pigments biliaires</u>	5
I. Historique des travaux sur la bilirubine	-
II. Métabolisme de la bilirubine dans l'organisme ..	9
III. Déviations pathologiques du métabolisme de la bilirubine	11
* <u>Propriétés physico-chimiques générales</u>	15
* <u>Dosage de la bilirubine sérique totale</u>	17
I. Colorimétrie directe	-
II. Colorimétrie après oxydation	20
III. Colorimétrie après copulation avec un diazoïque	21
1°. Discussion de la réaction utilisée	-
2°. Exposé des méthodes de dosage	23
3°. Etude des différentes solutions témoins proposées	29

* <u>Dosage séparé des différentes formes de bilirubine</u>	33
I. Vitesse de réaction avec le diazoréactif	34
II. Extraction de la bilirubine non conjuguée par les solvants organiques	38
III. Action des agents oxydants	41
IV. Dosage différentiel des pigments conjugués sanguins	42
* <u>Conclusion</u>	45

TRAVAUX PERSONNELS

Première partie : Dosage de la bilirubine totale

<u>Chapitre I</u> : Préparation des solutions témoins titrées en bilirubine	51
A. Etude expérimentale et critique des différentes solutions témoins	52
B. Recherches personnelles	54
C. Méthode proposée	57
D. Etude comparative des méthodes d'étalonnage	61
<u>Chapitre II</u> : Choix d'une méthode photométrique	71
A. Etude de la formule de diazoréactif	72
B. Etude systématique des réactifs "révélateurs"	73

C. Etude de la réaction obtenue avec le réactif de WITH	77
1. Analyse spectrophotométrique de la coloration	78
2. Importance du témoin de sérum et de réactifs	-
3. Stabilité de la coloration en fonction du temps	79
4. Reproductibilité des résultats	80
5. Sensibilité de la réaction	81
6. Influence de la dilution préalable des sérums très ictériques	82
7. Importance de la quantité de diazoréactif utilisée	-
D. Technique proposée	84
E. Applications	89

Deuxième partie : Dosage séparé des différentes fractions
de la bilirubine sérique

<u>Chapitre I : Dosage de la fraction "directe" par la</u> réaction de Van Den Bergh	97
1°. Technique utilisée au cours de nos essais	-
2°. Cinétique de la réaction obtenue sur divers sérums	98
3°. Influence de la dilution préalable pratiquée sur certains sérums	102

4°. Influence de l'ordre dans lequel sont mélangés les réactifs.....	103
5°. Comportement de la bilirubine non conjuguée dans la réaction directe.....	-
6°. Conclusions.....	106

<u>Chapitre II</u> : Extraction de la bilirubine non conjuguée par les solvants organiques.....	107
---	-----

<u>Chapitre III</u> : Action des oxydants sur les diverses formes de bilirubine sérique.....	111
---	-----

A. Action de l'eau oxygénée sur les sérums ictériques.....	112
B. Action de l'acide nitreux sur les sérums ictériques.....	113
1°. Essais préliminaires.....	114
2°. Etudes systématiques sur l'oxydation et la réaction colorée.....	116
1. Méthodes utilisées pour mettre en évidence l'action oxydante.....	-
2. Influence du réactif phosphonitreux sur la réaction colorée.....	119
3. Influence de la concentration en acide nitreux et du temps de contact.....	122
4. Influence de la dilution préalable des sérums très ictériques.....	129

5. Cas des sérums ictériques renfermant très peu de bilirubine non oxydable	131
6. Coloration obtenue et importance du témoin ..	--
7. Reproductibilité des résultats	132
8. Comparaison avec la réaction qualitative d'HIJMANS VAN DEN BERGH	133
3°. Discussion	135
4°. Technique proposée	137
CONCLUSIONS	143
BIBLIOGRAPHIE	145
ADDENDUM : Méthodes proposées pour l'analyse d'un sérum ictérique	155

Deuxième sujet proposé par le Jury :

TREMBLEMENTS EXPERIMENTAUX

D'ORIGINE CHIMIQUE

APPLICATIONS POSSIBLES A L'ETUDE
DES MEDICAMENTS ANTIPARKINSONIENS
